การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น ผลิตเมล็ดเทียมและตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยเทคนิค RAPD และ SSR ในปาล์มน้ำมัน

Embryogenic Suspension Induction, Artificial Seed Production and Evaluation of Variation by RAPD and SSR Technique in Oil Palm

คมกฤษณ์ อินเปื่อย

Komgrit Inpuay

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctor of Philosophy in Plant Science
Prince of Songkla University
2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น ผลิตเมล็ดเทียมและตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยเทคนิค RAPD และ SSR ในปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นายคมกฤษณ์ อินเปื่อย

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….....
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

……..…ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์)

…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)

…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สนธิชัย จันทร์เปรม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น ผลิตเมล็ดเทียมและตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยเทคนิค RAPD และ SSR ในปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นายคมกฤษณ์ อินเปื่อย

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

การชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตมีความเหมาะสมที่สุด โดยย้ายเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน ให้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1-3 มิลลิเมตร การเพิ่มปริมาณเซลล์เป็นไปได้ดีในอาหารสูตรเดียวกันปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นภายหลังการย้ายเลี้ยง 30 วัน เป็น 3.61 มิลลิลิตร (3.61 เท่า) อะดีนีนซัลเฟตความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมลงในอาหารให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 5.53 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน การเติมผงถ่านเข้มข้น 0.1เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไดแคมบา 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาของเซลล์และการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 117 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน ส่วนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 712.75 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ โซมาติกเอ็มบริโอขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร ให้อัตราการงอกสูงสุด 15.83 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอล ให้อัตราการเกิดของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 สูงสุดที่ 30.83 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายแคลเซียมไนเตรทความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้ผลิตเมล็ดเทียมของปาล์มน้ำมัน SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมสามารถงอกได้หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกภายใน 1 สัปดาห์ มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 95.24 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการงอก 77.78 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลา 1 เดือน และให้ต้นกล้าที่สมบรูณ์ 9.43 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและเซลล์ซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่า ทุกไพรเมอร์ของเทคนิค SSR (จำนวน 9 ไพรเมอร์) และ 6 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPB-08 OPN-15 และ OPT-06 ของเทคนิค RAPD สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (monomorphism) จึงสรุปได้ว่า ไม่พบความแปรปรวนของเนื้อเยื่อในระหว่างขั้นตอนการเพาะเลี้ยงในการศึกษานี้

Thesis Title	Embryogenic Suspension Induction, Artificial Seed Production and Evaluation of Variation by RAPD and SSR Technique in Oil Palm
Author	Mr. Komgrit Inpuay
Major Program	Plant Science
Academic Year	2011

Abstract

The embryogenic callus derived from young leaf of mature oil palm was suitable for cell suspension induction. Callus was transferred to MS liquid medium supplemented with 1 mg/l dicamba, 200 mg/l ascorbic acid and 3% sucrose. This produced a fine cell aggregates with 1-3 mm in size after being cultured for 3 months. Cell suspension proliferation was performed by transferring 1 ml packed cell volume (PCV) to a fresh same medium composition. Sub-culturing at monthly intervals gave the highest proliferation rate at 3.61 PCV (3.61 times). MS medium supplemented with 40 mg/l adenine sulfate gave the highest packed cell volume (5.53 ml) after 30 days of culture. Dicamba at concentration of 0.75 mg/l together with 0.1% activated charcoal promoted embryogenesis at 100% and a number of produced somatic embryos at 117.58 embryos/flask after being cultured for 6 months. The MS medium supplemented with 0.2 M sorbitol and 3% sucrose gave somatic embryo induction rate at 91.81% and a number of somatic embryos at 712.75 embryos/flask. Germination of somatic embryos was obtained from those embryo at size bigger than 2 mm at 15.83%. The somatic embryo induced from MS medium supplemented with 0.2 M sorbitol gave the highest of SSE induction rate at 30.83% after 6 months of culture. Sodium alginate at 2.5%, immersed in 100 mM calcium nitrate for 15 minutes was suitable to produce artificial seeds of oil palm. Encapsulated coleoptiles-staged SSEs were germinated shoots after being cultured on hormone-free MS medium for 1 week. The survival and germination rate were 95.24 and 77.78%, respectively after one month of culture. Complete plantlets

obtained from this protocol were successfully transferred to soil at 9.43% after 5 months of germination. Verification of somaclonal variation from embryogenic callus cell suspension and leaf of seedling revealed that 9 primers of SSR and six RAPD primers namely OPAB-01, OPAB-09, OPAB-14, OPR-11, OPT-06 and OPA-03 showed clearly DNA patterns with monomorphism bands. The results obtained from these studies suggest that there is no somaclonal variation in this suspension culture protocol.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(17)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	5
วัตถุประสงค์	20
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	21
วัสดุ อุปกรณ์	21
วิธีการวิจัย	26
3 ผล	37
4 วิจารณ์	88
5 สรุป	98
เอกสารอ้างอิง	100
ภาคผนวก	116
ประวัติผู้เขียน	122

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของเจลและความเข้มข้นที่ใช้ในการห่อหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอ	14
2	ผลของชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารต่อการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นเมื่อวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มีแสงเป็นเวลา 3 เดือน	39
3	ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากวางเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างๆ	41
4	ผลของปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่างๆ	42
5	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	44
6	ผลของความถี่ในการย้ายเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 เดือน	46
7	ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน	48

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	ผลของความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	50
9	ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่างๆ	52
10	ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาร่วมกับผงถ่านต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	54
11	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแอลกอฮอล์ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ต่อลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่พัฒนาในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	56
12	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแอลกอฮอล์ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ต่อการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างๆ	59
13	ผลของความเข้มข้นของซอร์บิทอลร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมลงในอาหารต่อขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน	61
14	ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อความสามารถในการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน	64

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	อัตราการรอดชีวิตและการงอกของ SSE ระยะต่างๆ ที่ผ่านและไม่ผ่านการห่อหุ้มหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลาต่างๆ	73
16	ลักษณะการงอกของ SSE ที่ได้รับและไม่ได้รับการห่อหุ้มหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลาต่างๆ	74
17	ความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวด้วยเทคนิค RAPD	79

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบการกระจายตัวของประชากรปาล์มน้ำมันในการให้ผลผลิต	3
2	รูปแบบการเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น	6
3	โครงสร้างและองค์ประกอบของเมล็ดเทียม	13
4	กระบวนการผลิตเมล็ดเทียม	15
5	การเกิดพันธะไอออนิกระหว่างแอลจิเนตกับสารละลาย อิเล็กโตรไลท์	16
6	แคลลัสที่ใช้ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)	21
7	โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (SSE) ระยะต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตเมล็ดเทียม ได้แก่ กลม: g ทอร์ปิโด: t สร้างจาว: h สร้างใบเลี้ยง: co และกลุ่มก้อนของ SSE ระยะรูปกลม: cl (บาร์เท่ากับ 5 มิลลิเมตร)	32
8	ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นที่ชักนำได้จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันต้นโตโคลนเทพาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับออกซินชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลาต่างๆ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)	38
9	ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	41
10	ผลของปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นเมื่อในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน	43
11	ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน	44

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ลักษณะของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน (บาร์เท่ากับ 50 ไมโครเมตร)	45
13	ผลของความถี่ในการย้ายเลี้ยงต่อการเพิ่มของปริมาตรตะกอนเซลล์หลังจากวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 30 วัน	47
14	ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	49
15	ผลของความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเพิ่มปริมาตรของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	50
16	ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 50 ไมโครเมตร)	52
17	โซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับผงถ่านเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 เดือน (บาร์เท่ากับ 100 เซนติเมตร)	54
18	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแอลกอฮอล์ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ต่อลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่พัฒนาในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	57
19	ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับการเติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)	58

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	ลักษณะและขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 เดือน (บาร์เท่ากับ 2 มิลลิเมตร)	62
21	ลักษณะและขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน	62
22	ลักษณะและขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน	63
23	การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)	65
24	การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ลดความเข้มข้นของไดแคมบาหรือเติมผงถ่าน หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์	66
25	การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมซอร์บิทอลหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์	67
26	การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ บนอาหารแข็งหรือในอาหารเหลวแบบชั่วคราว หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)	69

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
27	การห่อหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันด้วยอาหารสูตร MS เติมโซเดียมแอลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แช่ในสารละลายแคลเซียมไนเตรทเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)	70
28	การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)	71
29	การผลิตเมล็ดเทียมจาก SSE ด้วยโซเดียมแอลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ แช่ในสารละลายแคลเซียมไนเตรทเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที และวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นระยะเวลาต่างๆ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)	75
30	การงอกของเมล็ดเทียมหลังจากวางเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)	75
31	การงอกของเมล็ดเทียมหลังจากวางเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นระยะเวลา 1 เดือน (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)	76
32	การงอกของเมล็ดเทียมหลังจากวางเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นระยะเวลาต่างๆ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)	77
33	ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันแหล่งต่างๆ	78
34	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ขัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAB-01 (ก) OPAB-09 (ข) และ OPAB-14 (ค)	80
35	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ขัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-08 (ก) OPN-15 (ข) และ OPT-06 (ค)	81
36	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ขัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPA-03 (ก) และ OPA-19 (ข)	82
37	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ขัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPJ-04 (ก) และ OPR-11 (ข)	83

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
38	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค SSR เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008	84
39	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค SSR เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243 (ก) EgCIR0337 (ข) และ EgCIR0409 (ค)	85
40	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค SSR เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446 (ก) EgCIR0465 (ข) และEgCIR0781 (ค)	86
41	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค SSR เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905 (ก) และ EgCIR1772 (ข)	87

บทที่ 1

บทนำ

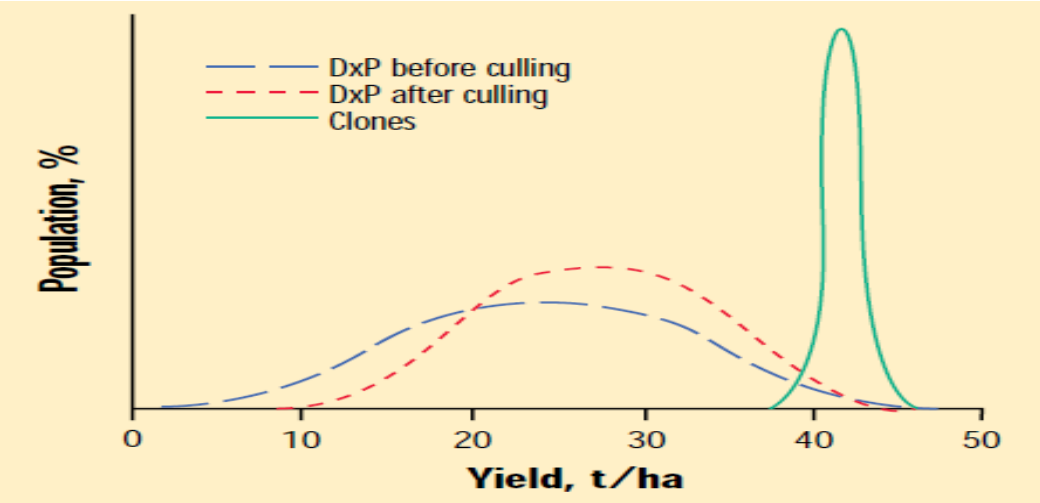
บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคใต้ เป็นพืชที่เป็นแหล่งน้ำมันเพื่อการบริโภคที่สำคัญของโลก น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในของปาล์มประกอบด้วยกรดไขมันอิสระชนิดต่าง ๆ ที่สามารถแยกให้บริสุทธิ์แล้วนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องเพื่อการอุปโภคและบริโภค (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ, 2541) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ (ถั่วเหลือง เรพซีดและทานตะวัน) ปาล์มน้ำมันได้รับการจัดว่าเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากที่สุด ด้วยเหตุผลที่ว่า ให้ประสิทธิภาพการใช้ที่ดินและผลผลิตสูงที่สุด นอกจากนี้ยังมีศักยภาพในการเป็นพลังงานทดแทน มีประสิทธิภาพในการจัดการปุ๋ยและสารกำจัดศัตรูพืชสูง จึงทำให้มีสารพิษตกค้างในแปลงปลูกน้อยและเป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมต่ำ (Datuk, 2003) ซึ่งขณะนี้ การใช้น้ำมันปาล์มของโลกสูงขึ้นเฉลี่ยปีละ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และในอนาคตปาล์มน้ำมันยังมีบทบาทที่สำคัญอีกบทบาทหนึ่งคือการใช้ผลิตไบโอดีเซล (เปรมปรี, 2549) ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ปาล์มน้ำมันจึงนับเป็นหนึ่งในยุทธศาสตร์แก้ไขปัญหาด้านพลังงานของประเทศในการพัฒนาพลังงานทดแทนน้ำมัน โดยในปี 2555 รัฐได้กำหนดเป้าหมายส่งเสริมการผลิตและการใช้ไบโอดีเซลให้ได้ร้อยละ 10 ของการใช้น้ำมันดีเซลทั้งหมดหรือจำนวน 8.5 ล้านลิตรต่อวัน (กระทรวงพลังงาน, 2549) ปัญหาหลักอย่างหนึ่งในการผลิตปาล์มน้ำมันคือพันธุ์ที่ใช้ปลูก โดยปาล์มน้ำมันที่ใช้ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันคือพันธุ์เทเนอรา ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา แม้ว่าในปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมได้เอง แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร จึงยังคงมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากต่างประเทศ เช่น มาเลเซีย คอสตาริกาและบางประเทศในทวีปแอฟริกาโดยเฉพาะประเทศมาเลเซียซึ่งมีนโยบายกีดกันการส่งออกเมล็ดพันธุ์ดี จึงมีการลักลอบนำเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันเข้ามายังประเทศไทย ซึ่งอาจมีพันธุ์ไม่ดีปะปนเข้ามาด้วย นอกจากนี้ แม้ว่าพันธุ์ที่นำเข้ามาจะเป็นพันธุ์ลูกผสมเทเนอราจริง แต่ก็เป็นพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงให้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศผู้ผลิต ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับพื้นที่ปลูกในประเทศไทย

ปาล์มน้ำมันเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ จัดเป็นพืชผสมข้ามที่มีช่อตัวผู้และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกันแต่มีช่วงเวลาการออกดอกไม่พร้อมกัน (Corley and Tinker, 2003) เป็นพืชดิพลอยด์ที่มีจำนวนชุดโครโมโซม 2n=2x=32 เริ่มให้ผลผลิตหลังจากปลูกลงแปลงแล้ว 2-3 ปี และให้ผลผลิตตลอดจนมีอายุประมาณ 25 ปี จึงทำการปลูกใหม่ พืชนี้จัดอยู่ในสกุล *Elaeis* สามารถจำแนกออกได้เป็น 3 ชนิด คือ *Elaeis guineensis Elaeis oleifera* และ *Elaeis odora* ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและนิยมปลูกกันเพื่อการค้า คือ *E. guineensis* ซึ่งสามารถจำแนกตามลักษณะของผลปาล์มได้เป็น 3 แบบ คือ ดูรา (Dura) เป็นแบบที่ผลมีกะลาหนาซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ (DD) นิยมใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ในการผลิตลูกผสม แบบที่ 2 คือ ฟิสิเฟอรา (Pisifera) เป็นแบบที่ผลมีกะลาบางมากจนถึงมีลักษณะเป็นเยื่อบางๆ หุ้มเมล็ดซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ (dd) นิยมใช้เป็นต้นพ่อพันธุ์ในการผลิตลูกผสม แบบสุดท้ายคือ เทเนอรา (Tenera) ผลมีกะลาบางความหนาอยู่ระหว่างแบบดูรากับฟิสิเฟอราซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนพันธุ์ทาง 1 คู่ (Dd) เกิดจากการผสมระหว่างแบบดูรากับฟิสิเฟอรา อย่างไรก็ตาม การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันแบบดูราและฟิสิเฟอรามีลักษณะแบบข่มไม่สมบูรณ์ ทำให้เมล็ดที่เก็บจากโคนต้นมาเพาะขยายพันธุ์มีความแปรปรวนสูงมาก โดยเฉพาะลักษณะของผลปาล์มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยการกระจายตัวของลูกผสมในชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของลูกผสมแบบเทเนอรามีต้นแบบดูรา เทเนอราและฟิสิเฟอราในอัตราส่วน 1:2:1 ตามลำดับ ทำให้ผลผลิตทะลายสดลดลง 15-50% และเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มดิบลดลง 35-55% ส่งผลให้รายได้จากการขายทะลายปาล์มสดต่อไร่ต่อปีลดลงประมาณ 30-40% (ธีระ, 2554) และที่สำคัญคือไม่สามารถนำเมล็ดพันธุ์จากต้นเทเนอรามาใช้ในการขยายพันธุ์ได้ จึงจำเป็นต้องมีการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเทเนอราอยู่เสมอ ซึ่งการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีใช้เมล็ดนั้นต้องมีการแก้การพักตัวของเมล็ด โดยการอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50-90 วัน หลังจากนั้นจึงนำเมล็ดไปแช่น้ำอีก 7 วัน แล้วเพาะเมล็ดในห้องเพาะอีก 30-45 วัน สุดท้ายจึงนำเมล็ดงอกไปเพาะในถุงชำในโรงเรือนอนุบาลแรก (ธีระ และคณะ, 2548) หากปล่อยให้เมล็ดงอกเองตามธรรมชาติต้องใช้เวลานาน 3-6 เดือน และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ Kushairi และคณะ (2010) รายงานการผลิตเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมในช่วงระหว่างปี 2008-2009 ว่าอินโดนีเซียมีการผลิตเมล็ดพันธุ์สูงที่สุดจำนวน 250 ล้านเมล็ดต่อปี รองลงมาคือ มาเลเซียมีการผลิต 81.5 ล้านเมล็ดต่อปี ส่วนไทยมีกำลังการผลิต 13 ล้านเมล็ดต่อปี ในจำนวนนี้เป็นของบริษัทยูนิวานิชจำนวน 8 ล้านเมล็ด และจากภาครัฐจำนวน 5 ล้านเมล็ด ในขณะที่ การผลิตต้นกล้าจาก

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประมาณ 3.5 ล้านต้นต่อปี แบ่งเป็นมาเลเซีย 2.5 ล้านต้น คอสตาริกา 0.5 ล้านต้น และอินโดนีเซีย 0.5 ล้านต้น

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องใช้เวลามากกว่า 4 ปีขึ้นไป ซึ่งสามารถใช้แหล่งของชิ้นส่วนต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงได้แก่ ใบอ่อน (de Touchet, 1991) คัพภะ (Texeira *et al*., 1993) ช่อดอกและราก (Texeira *et al*., 1994; Duval *et al*.,1995b) การเพาะเลี้ยงรากแม้ทำได้แต่พบว่าชิ้นส่วนมีการปนเปื้อนสูง (Avril *et al*.,1986) การปลูกปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ผลผลิตสูงกว่าปาล์มน้ำมันจากการเพาะเมล็ดเนื่องจากมีความสม่ำเสมอที่สูงกว่า (ภาพที่ 1) Khaw และ Ng (1999) อ้างโดยสมปอง (2544) รายงานว่าต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนในประเทศมาเลเซียมีการกลายพันธุ์เพียง 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น นอกจากนี้ ยังพบว่าต้นพันธุ์ดังกล่าวยังให้ผลผลิตสูงกว่าต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอย่างน้อย 30 เปอร์เซ็นต์ การชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีในประเทศไทยเพื่อผลิตต้นพันธุ์ดีได้ดำเนินการมาตั้งแต่ปี 2526 นอกจากนี้ มีรายงานการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนและปลูกทดสอบในปี พ.ศ. 2533/34 จนขณะนี้ไม่พบความผิดปกติใดๆ ผลผลิตที่ได้มีแนวโน้มที่สูงกว่าต้นที่ปลูกจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงการชักนำแคลลัสจนกระทั่งได้พืชต้นใหม่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) N^6-Benzyladenine (BA) และ α-Naphthalene acetic acid (NAA) ในความเข้มข้นต่ำช่วงระหว่าง 0.1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Te-chato, 1998)



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบการกระจายตัวของประชากรปาล์มน้ำมันในการให้ผลผลิต

ที่มา: Mutert และ Fairhurst (1999)

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพทางเซลล์พืช เช่น การผลิตเมล็ดเทียม มีความก้าวหน้ามากในไม้ผลและไม้ยืนต้นหลายชนิด ในกรณีปาล์มน้ำมันก็ทำนองเดียวกัน มีรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นและเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นเพื่อ ใช้ผลิตเมล็ดเทียม (Duval *et al*., 1995c; Aberlence-Bertossi *et al*., 1999) เนื่องจากโซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นเอ็มบริโอเดี่ยวๆ และมีขนาดที่สม่ำเสมอ อย่างไรก็ตาม โซมาติกเอ็มบริโอมีอัตราความงอกต่ำและมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูง ดังนั้นการใช้ประโยชน์เพื่อขยายพันธุ์เชิงการค้าจึงต่ำ

ลักษณะผิดปกติที่เป็นผลมาจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ การแตกกอ (tillering) ไคเมอรา (chimera) การพัฒนาของดอกที่ยอด การผลิตเฉพาะดอกตัวผู้ (androgyny) หรือดอกกระเทย (hermaphroditism) ช่อดอกเป็นหมัน (sterility) การพัฒนาของผลโดยไม่ได้รับการผสม (parthenocarpy) และการเกิดลักษณะผลแบบแมนเทิ้ล (Mutert and Fairhurst, 1999; สมปอง, 2544) ซึ่งแสดงอาการให้เห็นในระยะต้นกล้าทั้งในหลอดทดลองและระยะอนุบาลในถุงเพาะชำไปจนถึงระยะให้ผลผลิต การตรวจสอบความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง นอกจากช่วยร่นระยะเวลาในการคัดทิ้งต้นที่มีความผิดปกติแล้วยังช่วยลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมคือ เครื่องหมายทางชีวโมเลกุล อันได้แก่ random amplified polymorphic DNA (RAPD) amplified fragment length polymorphic DNA (AFLP) และ simple sequence repeat (SSR) ดังเช่นการรายงานของ Mohan (2001) ได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะโซมาติกเอ็มบริโอโดยไม่ต้องรอให้มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ อีกทั้งยังสามารถจำแนกแหล่งพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในพื้นที่ภาคใต้ได้อีกด้วย (สายชล, 2547) ซึ่งสามารถช่วยร่นระยะเวลาในการคัดเลือกพันธุ์ได้

ในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นต่ำที่ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอและผลิตเมล็ดเทียม ให้ได้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น เพื่อขยายพันธุ์เชิงพาณิชย์ตอบสนองนโยบายการขยายพื้นที่ปลูกของรัฐ

การตรวจเอกสาร

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นได้เกิดขึ้นครั้งแรกโดย Caplin และ Steward (1949) โดยทั่วไป การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเริ่มต้นจากการย้ายแคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) ลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเหมือนกับสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสมีความเหมาะสมที่สุด (Bhojwani and Razdan, 1996) นอกจากนี้ สัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินที่เหมาะสมยังมีผลต่อการกระจายตัวของเซลล์ให้มากขึ้นอีกด้วย อย่างเช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของยาสูบ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D จาก 0.3 เป็น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสส่งผลให้ได้เซลล์ซัสเพนชั่นที่มีความละเอียดมากขึ้น (Reynolds and Murashige, 1979) การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นจำเป็นต้องมีการเขย่าอยู่ตลอดเวลาบนเครื่องเขย่าเลี้ยงแบบหมุนวนที่ความเร็ว 30-150 รอบต่อนาที ทำให้เซลล์มีการแตกตัวออกจากกลุ่มก้อนของแคลลัสเริ่มต้นแล้วกระจัดกระจายอยู่ในอาหารเหลว เมื่อเซลล์ที่อยู่ในอาหารเหลวมีการแบ่งตัวก็ทำให้เกิดกลุ่มก้อนของเซลล์ขนาดเล็กๆ เกิดขึ้น นอกจากนี้ ปริมาตรของอาหารต้องเหมาะสมกับขนาดของภาชนะที่ใช้บรรจุด้วย เช่น ฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร ควรใส่อาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ควรใส่อาหารปริมาตร 70 มิลลิลิตร (Chawla, 2004) ดังนั้น เซลล์ซัสเพนชั่นจึงประกอบด้วยเซลล์เดี่ยวๆ และกลุ่มก้อนของเซลล์ขนาดเล็กๆ กระจายอยู่ในอาหารเหลว

เซลล์และกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีอัตราการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในสภาวะควบคุมทั้งปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงและสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมส่งเสริมให้เซลล์ซัสเพนชั่นมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดจากการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์ จนกระทั่งปัจจัยที่ใช้ในการเจริญเติบโตมีอย่างจำกัด (การเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นตั้งแต่ 1 สัปดาห์ขึ้นไป) รูปแบบการเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นจะดำเนินไปและแบ่งออกได้เป็น 5 ระยะ ดังภาพที่ 2 คือ

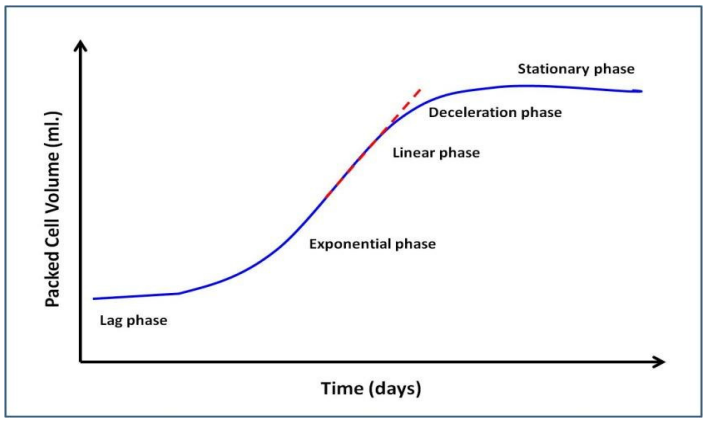
- Lag phase เป็นระยะที่เซลล์มีการเตรียมความพร้อมในการแบ่งเซลล์

- Exponential phase เป็นระยะที่เซลล์มีอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มเป็น 2 เท่าของเซลล์เริ่มต้น

- Linear phase เป็นระยะที่เซลล์มีอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มสูงขึ้นเป็นเส้นตรง

- Deceleration phase เป็นระยะที่เซลล์มีอัตราการแบ่งเซลล์และการยืดยาวของเซลล์ลดลง

- Stationary phase เป็นระยะที่เซลล์ไม่มีการแบ่งเซลล์ทำให้จำนวนและขนาดของเซลล์คงที่



ภาพที่ 2 รูปแบบการเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งของปาล์มน้ำมันมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากมีความสามารถในการผลิตพืชต้นใหม่ในอัตราที่ต่ำ ใช้แรงงานและพื้นที่มาก (Soh *et al*., 2006) ความไม่สม่ำเสมอของระยะการพัฒนาของเอ็มบริโอ การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นที่สูง รวมทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยาวนานจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ในชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงขึ้น วิธีการที่เป็นไปได้ในการลดปัญหานี้คือวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น การวิจัยเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันเริ่มต้นขึ้นในห้องปฏิบัติการหลาย ๆ แห่งและประสบผลสำเร็จในการผลิตพืชต้นใหม่ (de Touchet *et al*., 1991; Sondahl, 1991; Teixeira *et al*., 1995) Tahardi (1999) รายงานว่า สามารถผลิตโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันได้ 295-523 เอ็มบริโอ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ นอกจากนี้ Duval และคณะ (1995a) คาดคะเนว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน

สามารถผลิตโซมาติกเอ็มบริโอได้ 45,000 เอ็มบริโอต่อซัสเพนชั่น 1 ลิตรต่อเดือน ภาพรวมของการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1.1 การชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเริ่มต้นจากการย้ายแคลลัสที่มีลักษณะโครงสร้างเกาะกันหลวม ๆ ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่าเลี้ยงอยู่ตลอดเวลา ทำให้เซลล์แยกตัวออกมาจากแคลลัสเริ่มต้นแขวนลอยในอาหารเหลวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กๆ การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้โดยจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นปกติเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งและสามารถเพิ่มปริมาณพืชต้นใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (George and Sherrington, 1984) Wong และคณะ (1996) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันมีอัตราการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเป็น 2-3 เท่า ของปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยงต่อเดือน แต่ละระยะของการเพาะเลี้ยงมีความต้องการธาตุอาหารและสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันออกไป โดยทั่วไป ความต้องการสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงมีความจำเพาะในแต่ละโคลน รวมทั้งสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงซึ่งขึ้นอยู่กับประสบการณ์และพัฒนาการในการเพาะเลี้ยง โดยพื้นฐานแล้ว อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน กรดอะมิโน สารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำตาล ทั้งธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองมีความสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ อาหารสูตรของ Murashige และ Skoog (1962) เป็นสูตรอาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ซัสเพนชั่นกันอย่างแพร่หลาย สูตรอาหารอื่นที่นิยมใช้กันคือ สูตร Y_3 (Eeuwens, 1976; 1978) นอกจากนี้อาจมีการดัดแปลงสูตรอาหารดังกล่าวเพื่อความเหมาะสมในแต่ละชนิดของเนื้อเยื่อและวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง

ปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถแยกเป็น 3 กลุ่มหลัก อันได้แก่

1.1.1 ปัจจัยทางชีวภาพ

แคลลัสเริ่มแรกที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถชักนำได้จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นปาล์มน้ำมัน เช่น ราก ช่อดอก คัพภะและใบอ่อนทั้งจากต้นกล้าและต้น

โตที่ให้ผลผลิตแล้ว (Paranjothy and Rohani,1982; Wooi,1995; Te-chato, 1998; Kanchanapoom and Damyoas, 1999) แคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนใบให้อัตราการเพิ่มปริมาณของแคลลัสมากกว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนช่อดอก (Rajanaidu *et al*., 1997) แคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนใบมีความแข็งแรงและมีการพัฒนามากกว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนราก (Paranjothy, 1987) การชักนำแคลลัสทำได้โดยวางเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารเติม NAA หรือ 2,4-D หรือทั้งสองชนิดร่วมกันหรือ picloram (Khaw and Ng, 1997) หรือไดแคมบา (Te-chato, 1998) ประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสนอกจากขึ้นอยู่กับชนิดของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นแล้วยังขึ้นอยู่กับเชื้อพันธุกรรมด้วย เช่น การนำชิ้นส่วนพืชจากแหล่งพันธุกรรมของพันธุ์ La Me ให้อัตราการสร้างแคลลัสสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ ชิ้นส่วนจากพันธุ์ Yangambi ให้อัตราการสร้างแคลลัส 5-20 เปอร์เซ็นต์ (Wooi, 1995; Rajanaidu *et al*., 1997) Duval และคณะ (1995b) ได้แบ่งประเภทของแคลลัสที่ชักนำได้บนอาหารแข็งของปาล์มน้ำมันออกเป็น 2 ประเภท คือ fast growing callus (FGC) กับ nodular compact callus (NCC) Teixeira และคณะ (1995) นำแคลลัสเริ่มต้นที่มีลักษณะกลมซึ่งชักนำได้จากคัพภะที่ไม่สุกแก่มาใช้ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นได้ภายในระยะเวลา 2 เดือน ส่วนการใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวมๆ ซึ่งชักนำได้จากคัพภะระยะสุกแก่ชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นได้ในเวลา 3-5 เดือน

1.1.2 ปัจจัยทางเคมี

de Touchet และคณะ (1991) นำ friable embryogenic callus ที่มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร ซึ่งชักนำได้จากชิ้นส่วนใบอ่อนมาใช้ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตรที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักสูตร MS ดัดแปลงโดย Rabéchault และ Martin (1976) ธาตุอาหารรองของ Nitsch (1969) วิตามินของ Morel และ Wetmore (1951) เติม 2,4-D ความเข้มข้น 80-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่า เซลล์ซัสเพนชั่นที่ชักนำได้มีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดเท่ากับ 4 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน Teixeira และคณะ (1995) นำแคลลัสเริ่มต้นที่มีลักษณะกลมและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวมๆ มาใช้ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร Y_3 เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นภายใน 5 เดือน

Hughes และคณะ (1983) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซตเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

และน้ำตาลซูโครส 25 กรัมต่อลิตร Aberlenc-Bertossi และคณะ (1999) ได้เพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ 2,4-D ความเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ อะดีนีนซัลเฟตเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่านเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และกลูโคสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร Gorret และคณะ (2004) ได้เพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูตามีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่านเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และกลูโคสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร Tarmizi และคณะ (2003) ได้เพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดนิโคทินิคเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไมโออินโนซิทอลเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูตามีนเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการเพิ่มน้ำหนักสด 2.5 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

1.1.3 ปัจจัยทางกายภาพ

ปัจจัยทางกายภาพที่มีความจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น ได้แก่ ช่วงการย้ายเลี้ยง ความเร็วในการเขย่าเลี้ยง ความเข้มแสงและอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยง (Jay *et al*., 1992; Shimazu and Kurata, 1999; 2003) Choi และคณะ (2008) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 250 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส และย้ายเลี้ยงทุกๆ 10 วัน พบว่า มีอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาตรตะกอนเซลล์เท่ากับ 237 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน Tarmizi (2002) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในที่มืดที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ 2.5 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

1.2 การชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่น

การเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน โดยทั่วไป สามารถทำได้โดยการย้ายเซลล์ในซัสเพนชั่นไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4 สัปดาห์ (Rival, 2000) หลังจากนั้นกลุ่มเซลล์จะเริ่มมีการพัฒนาไปเป็น proembryo ที่ประกอบด้วยกลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญ

ในระยะนี้ต้องหยุดให้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินเพื่อที่จะให้กลุ่มเซลล์หยุดการเพิ่มปริมาณแต่มีการพัฒนาแทน ช่วงสุดท้ายของการชักนำให้เกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส เซลล์ในซัสเพนชั่นจะถูกกรองแยกขนาดและนำกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ไปทำการเพาะเลี้ยงต่อซึ่งจะทำให้แต่ละกลุ่มเซลล์มีการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ต้นเดี่ยวๆ

de Touchet และคณะ (1991) ได้ทำการย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นจากอาหารเหลวที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 80-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มาเลี้ยงบนอาหารแข็งหรือในอาหารเหลวที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่งผลให้โซมาติกเอ็มบริโอสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ 18.1 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาต่อเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ Kanchanapoom และ Tinnongjig (2001) ใช้ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น เมื่อสามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นได้แล้ว จึงย้ายเซลล์ซัสเพนชั่นไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำการงอกต่อไป

นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสและการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์อีกด้วย เช่น

1.2.1 น้ำตาล

นอกจากน้ำตาลจะเป็นแหล่งของคาร์บอนแล้ว ยังสามารถทำหน้าที่ได้หลายอย่างระหว่างกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส น้ำตาลในพืชโดยทั่วไปมีหน้าที่หลักคือ เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน นอกจากนี้ ยังทำหน้าที่เป็นสารออสโมติคัม สร้างสภาวะเครียดและตัวส่งสัญญาณควบคุมการทำงานของยีนในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคโปรตีน อย่างไรก็ตาม แต่ละบทบาทมีความสำคัญในแต่ละช่วงการเจริญเติบโตหรือพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอแตกต่างกัน โดยทั่วไป เป็นที่ยอมรับกันว่าพืชจะเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารที่มีการเติมน้ำตาลที่เฉพาะเจาะจงกับการเคลื่อนย้ายและง่ายต่อการนำไปใช้ (Leifert *et al.,* 1995)

ซูโครสเป็นแหล่งของคาร์บอนที่นิยมใช้มากที่สุดเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชหลายๆ ชนิดที่ใช้เพาะเลี้ยง (George, 1993) และเป็นปัจจัยหลักที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส ตั้งแต่การชักนำ การเพิ่มปริมาณและการสุกแก่ของโซมาติกเอ็มบริโอ (Finer *et al*., 1989; Tremblay and Tremblay, 1991; Schuller and Reuther, 1993) ความเข้มข้นของซูโครสมีความแตกต่างกันในแต่ละพืชที่เพาะเลี้ยง ซึ่งโดยส่วนใหญ่อยู่

ในช่วง 1-6 เปอร์เซ็นต์ มีการค้นพบว่าซูโครสบางส่วนในอาหารถูกย่อยโดยเอนไซม์ของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงแล้วกลายเป็นกลูโคสกับฟรุกโตส (Tremblay and Tremblay, 1995; Taber *et al*., 1998) แม้ว่าในทฤษฎีได้ระบุไว้ว่า ซูโครสจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วแล้วส่งผลกระตุ้นการพัฒนาของเอ็มบริโอ แต่บางกรณีก็ไม่สามารถใช้กลูโคส ฟรุกโตสหรือใช้ร่วมกันแทนซูโครสได้ (Taber *et al*., 1998; Iraqi and Tremblay, 2001)

น้ำตาลความเข้มข้นสูงสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพในการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสและการพัฒนาของเอ็มบริโอ (Loiseau *et al*., 1995) มีรายงานว่าการใช้ซูโครสความเข้มข้นสูงสามารถกระตุ้นการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสในฝ้ายได้เนื่องจากการเพิ่มของค่าออสโมติคัมในอาหาร (Zhang *et al*., 2000) แต่บางกรณี ซูโครสที่เติมลงไปในอาหารไม่สามารถเพิ่มค่าออสโมติคัมได้มากพอเพื่อชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ จึงจำเป็นต้องใช้น้ำตาลที่เฉพาะเจาะจงอย่างเช่น น้ำตาลแอลกอฮอล์ ได้แก่ แมนนิทอลหรือซอร์บิทอล (Li *et al*., 1995; Bronsema *et al*., 1997)

1.2.2 ไนโตรเจน

ไนเตรทและแอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนในรูปอนินทรีย์สารที่นิยมใช้เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Murashige and Skoog, 1962; Niedz, 1994) แหล่งของไนโตรเจนเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นโปรตีน กรดอินทรีย์และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชหลังจากการดูดซับและผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์พืช (Preece, 1995) นอกจากนี้ ความเข้มข้น โครงสร้างและสัดส่วนของไนโตรเจนยังมีผลต่อการแบ่งเซลล์ การเจริญ การพัฒนาและการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (Mordhorst and Lorz, 1993) และมีผลต่อปริมาณของคลอโรฟิลล์ กิจกรรมของยีนรูบิสโค (*rubisco*) อัตราการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Guidi *et al.,* 1998) อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง การสร้างแอนโทไซยานิน (Jain *et al.,* 1999) น้ำหนักสด ปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีนและค่าออสโมติกโพเทนเทียล (Mashayekhi-Nezamabadi, 2000)

กรดอะมิโนเป็นแหล่งของไนโตรเจนและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มีผลช่วยส่งเสริมการชักนำ การเพิ่มปริมาณ การสุกแก่และการพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอไปเป็นพืชต้นใหม่ ชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนมีบทบาทสำคัญในแต่ละระยะของกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส ในเกือบทุกกรณี การเติมสารอินทรีย์ไนโตรเจนลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง มีผลด้านบวกต่อการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส

(Robichaud *et al*., 2004; Zouine and Hadrami, 2007) ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้พลังงานน้อยในการย่อยสลายภายในเซลล์ของพืชเมื่อเปรียบเทียบกับสารอนินทรีย์ไนโตรเจน (Norgaard and Krogstrup, 1991)

Ramakrishnan และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของสูตรอาหารและสารตัวเติมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส กลุ่มเอ็มบริโอเริ่มต้น (proembryonic mass; PEMs) และเซลล์ซัสเพนชั่นของถั่วพุ่มจากชิ้นส่วนใบจริงคู่แรกของต้นกล้า พบว่า อาหารสูตร MMS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ กลูตามีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และไฟตาเจลเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้เกิดการสร้างแคลลัสสูงสุด 95.7 เปอร์เซ็นต์ และการเกิด PEMs สูงสุด 49.6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า อาหารสูตร MMS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ กลูตามีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้เซลล์ซัสเพนชั่นมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 32.4 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน และมีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในระยะต่างๆ สูงสุด

3. การผลิตเมล็ดเทียม

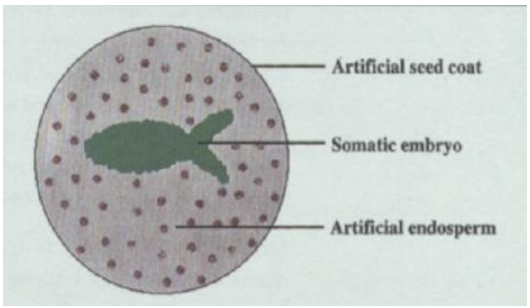
เมล็ดเทียมมีการผลิตขึ้นครั้งแรกในปี 1970 การผลิตเมล็ดเทียมมีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อพืชที่ไม่สามารถผลิตเมล็ดปกติได้ตามธรรมชาติ หรือผลิตเมล็ดได้ในปริมาณน้อย เนื่องจากเมล็ดเทียมมีขนาดเล็กจึงทำให้ง่ายต่อการเก็บรักษา การปฏิบัติ การขนส่งและการเพาะปลูก

3.1 องค์ประกอบของเมล็ดเทียม

เมล็ดเทียมสามารถทำได้โดยการนำส่วนขยายพันธุ์ของพืชมาห่อหุ้มด้วยสารอาหารเพื่อทำหน้าที่แทนเอนโดสเปิร์มภายในเมล็ดพืช ซึ่งช่วยส่งเสริมให้ส่วนขยายพันธุ์ดังกล่าวสามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นพืชได้ โดยทั่วไปเมล็ดเทียมประกอบด้วยเอ็มบริโอหรือต้นอ่อน เอนโดสเปิร์มเทียมและเปลือกหุ้มเมล็ด

3.1.1 เอ็มบริโอหรือต้นอ่อน

เมล็ดเทียมสามารถทำได้โดยการนำส่วนขยายพันธุ์ของพืชอาจเป็นตายอด หรือ ต้นอ่อนที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (โซมาติกเอ็มบริโอ) มาห่อหุ้มด้วยสารอาหาร (ภาพที่ 3) เพื่อทำหน้าที่แทนเอนโดสเปิร์มและทำให้ส่วนขยายพันธุ์นั้นสามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นพืชได้ โดยควบคุมปริมาณการใช้สารเคมีในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงให้เหมาะสม จากการรายงานในพืชหลายๆ ชนิด มีความนิยมผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้โซมาติกเอ็มบริโอ การผลิตโซมาติกเอ็มบริโอที่มีคุณภาพสูงและแข็งแรง ส่งผลให้มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ดีเท่าเทียมกับต้นพืชที่เจริญมาจากเมล็ด การผลิตโซมาติกเอ็มบริโอเป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวิธีนี้ เพราะเอ็มบริโอที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้เป็นข้อจำกัดของการผลิตเมล็ดเทียม เทคโนโลยีเมล็ดเทียมเป็นสิ่งที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตและทำให้ได้โซมาติกเอ็มบริโอที่มีคุณภาพสูงผลิตได้ในจำนวนมากและมีการสุกแก่ที่พร้อมกัน



ภาพที่ 3 โครงสร้างและองค์ประกอบของเมล็ดเทียม
ที่มา: Saiprasad (2001)

3.1.2 เอนโดสเปิร์มเทียมและเปลือกหุ้มเมล็ด

- เอนโดสเปิร์มเทียม

ในการผลิตเมล็ดเทียม สารที่นำมาใช้ห่อหุ้มจะมีลักษณะเป็นเจลซึ่งเป็นสารสกัดที่ได้มาจากหญ้าทะเล (วุ้น คาราจีแนนหรือ แอลจิเนต) พืช (arabic หรือ tragacanth) จุลินทรีย์ (dextran, gellan หรือ xanthan gum) หรือสารประกอบอื่นๆ เช่น polyco 2133 (Bordon Co.) carboxy methyl cellulose gelrite (Kelko. Co.) guargum sodium pectate และ tragacanth gum (ตารางที่ 1) โดยทั่วไปสารที่นิยมนำมาใช้ในการห่อหุ้มคือแอลจิเนต เนื่องจากมีความหนืดพอเหมาะง่ายต่อการปฏิบัติและกลายเป็นวุ้นได้เร็ว โดยเปลี่ยนสถานะกลายเป็นเจลเมื่อทำการผสมหรือหยดลงในสารละลายอิเล็กโตรไลท์ที่เหมาะสม (คอปเปอร์ซัลเฟต แคลเซียม

คลอไรด์หรืออลูมิเนียมคลอไรด์) ซึ่งจะเกิดพันธะไอออนิกทำให้สารมีความเสถียรขึ้น แอลจิเนตเป็นพิษต่อโซมาติกเอ็มบริโอต่ำ ราคาถูก สามารถเก็บรักษาได้ในระยะยาว มีความแข็งแรงในการป้องกันโซมาติกเอ็มบริโอจากแรงกระทำจากการปฏิบัติงานและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ

ตารางที่ 1 ชนิดของเจลและความเข้มข้นที่ใช้ในการห่อหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอ

Gel	Concentration (%)	Complexing agents	Concentration (mM)
sodium or	0.5-5.0	$CaCl_2$	30-100
potassium alginate		$LaCl_2$	
		$CoCl_2$	
		$FeCl_2$	
		$Ca(NO_3)_2$	
		$Ca(OH)_2$	
sodium alginate	2.0		
with gelatin	5.0	$CaCl_2$	300-100
carrageenan with	0.2-0.8	KCl	500
locust bean gum	0.4-1.0	NH_4Cl	500
guar gum	2.0	sodium tetraborate	100-120
agar	5-8	tannic seed	100
gelrite	0.15-0.25	none	-
sodium pectate	2.0	$CaCl_2$	100
		$CaSO_4$	100

ที่มา: Fiji และคณะ (1987)

- สารตัวเติมและสารป้องกัน

เนื่องจากโซมาติกเอ็มบริโอไม่มีเยื่อหุ้มเมล็ดและเอนโดสเปิร์มที่ทำหน้าที่ป้องกันต้นอ่อนและแหล่งให้สารอาหารเหมือนในไซโกติกเอ็มบริโอในช่วงการพัฒนาของเมล็ด ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในสารที่ใช้ห่อหุ้มเพื่อให้มีหน้าที่เหมือนกับเอนโดสเปิร์มในเมล็ด ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการงอกและความมีชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโอ อีกทั้งเมล็ดที่ผลิตได้ยังมีอายุการเก็บรักษาได้สูงถึง 6 เดือน โดยปราศจากการ

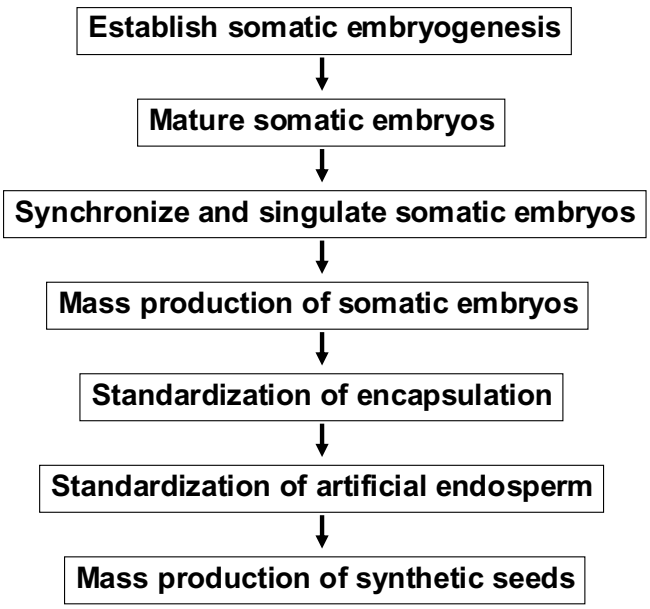
สูญเสียความมีชีวิตเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อาจมีการเติมยาปราบวัชพืชและยาป้องกันเชื้อราลงในสารที่ใช้ห่อหุ้มด้วย

มีการใช้สารหลายชนิดในการป้องกันต้นอ่อนจากการลดความชื้นและสิ่งกระทบกระเทือนภายนอก ได้แก่ สารอาหาร ยาป้องกันเชื้อรา ยากำจัดแมลง สารปฏิชีวนะและจุลินทรีย์ต่างๆ (เช่น ไรโซเบียม) การเติมผงถ่านช่วยส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโอมีความแข็งแรงและพัฒนาเป็นต้นกล้าที่ปกติต่อไปทั้งนี้เพราะว่าผงถ่านช่วยดูดซับสารอาหารเอาไว้และปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ

3.2 การผลิตเมล็ดเทียมและการนำไปใช้ประโยชน์

3.2.1 กระบวนการผลิตเมล็ดเทียม

กระบวนการผลิตเมล็ดเทียมเริ่มต้นตั้งแต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้มาซึ่งส่วนขยายพันธุ์ที่ใช้ โดยทั่วไป นิยมใช้โซมาติกเอ็มบริโอในการผลิตเมล็ดเทียม กระบวนการผลิตเมล็ดเทียมทำได้ดังสรุปในภาพที่ 4

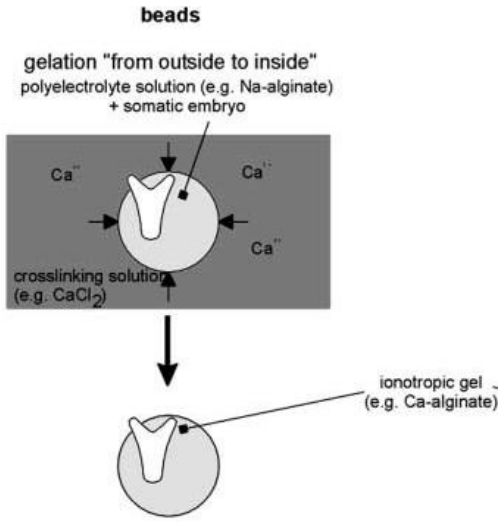


ภาพที่ 4 กระบวนการผลิตเมล็ดเทียม

ที่มา: Saiprasad (2001)

3.2.2 ขั้นตอนการผลิตเมล็ดเทียม

แอลจิเนตมีโครงสร้างเป็นสายเดี่ยว มีขั้ว สามารถละลายในน้ำได้และเป็นกรด polyuronic acid ประกอบด้วย hydro-ß-D-mannuronic acid เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1-4 หลักการปฏิบัติในการผลิตเมล็ดเทียมโดยการใช้แอลจิเนต คือ การหยดสารละลายโซเดียมแอลจิเนตที่มีโซมาติกเอ็มบริโออยู่ภายในลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ หลังจากนั้นเกิดการก่อตัวเป็นเม็ดกลมเนื่องจากเกิดการแลกเปลี่ยนประจุระหว่าง Na^{+} ในสารละลายโซเดียมแอลจิเนตกับ Ca^{2+} ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (ภาพที่ 5) ความแข็งและความยืดหยุ่นของเมล็ดเทียมขึ้นอยู่กับจำนวนประจุที่มีการแลกเปลี่ยน โดยทั่วไป มีการใช้โซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ และระยะเวลาที่ใช้ในการจุ่มแช่ 30 นาที ซึ่งทำให้ได้เมล็ดเทียมที่มีความเหมาะสมและมีชีวิตสูง



ภาพที่ 5 การเกิดพันธะไอออนิกระหว่างแอลจิเนตกับสารละลายอิเล็กโตรไลท์
ที่มา: Pavel และคณะ (2000)

4. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของพืชแต่ละสายพันธุ์นั้นสามารถใช้เครื่องหมายหลักๆ เพื่อตรวจสอบได้ 3 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมายลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมายสารชีวเคมีและเครื่องหมายโมเลกุล

4.1 เครื่องหมายลักษณะทางสัณฐาน

เครื่องหมายลักษณะทางสัณฐานได้ถูกใช้เป็นตัวเปรียบเทียบความแปรปรวนพื้นฐาน ทำได้โดยการสังเกตจากลักษณะภายนอก หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ความสูง ลักษณะทรงพุ่ม สีของลำต้น ขนาด รูปร่างและสีของเมล็ด อายุวันออกดอกและวันเก็บเกี่ยว อย่างไรก็ตาม ลักษณะดังกล่าวมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (Powell *et al*., 1996) จึงทำให้การใช้ลักษณะสัณฐานไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชบางชนิดที่มีลักษณะต่าง ๆ ใกล้เคียงกันมาก ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ด้วยสายตา

4.2 เครื่องหมายทางชีวเคมี

เครื่องหมายทางชีวเคมีนิยมตรวจสอบในระดับโปรตีนซึ่งเป็น codominant markers โดยตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนต่าง ๆ การใช้เทคนิคไอโซไซม์เป็นเครื่องหมายที่สร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น เปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรสและแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส เป็นต้น หากรูปแบบของเอนไซม์หรือไอโซไซม์ที่ได้เหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแปรปรวนในรูปแบบของเอนไซม์ที่ตรวจสอบ ในการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันได้มีการใช้เทคนิคนี้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยง (อาสลัน, 2551) แม้ว่า ไอโซไซม์มีค่าใช้จ่ายถูกกว่าและใช้เวลาน้อยกว่าการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ แต่ยังมีข้อจำกัดของการตรวจสอบคือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย นอกจากนี้ โปรตีนและเอนไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้ โอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ (de Vienne, 2003) ทำให้แยกความแตกต่างได้ไม่ดีเท่าที่ควร

4.3 เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุลมีข้อดีที่สามารถทำการคัดเลือกพืชได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโตและพัฒนา แม้แต่ในระยะต้นกล้า ทำให้มีข้อได้เปรียบเป็นอย่างมากโดยเฉพาะพืชที่มีวงจรชีวิตยาวนาน เช่น ปาล์มน้ำมัน ไม่มีอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องและสามารถตรวจสอบลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนด้อยหรือลักษณะที่ไม่สามารถตรวจสอบโดยอาศัยลักษณะภายนอกได้ จึงเป็นเครื่องหมายที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด เครื่องหมายโมเลกุลมีหลายชนิด เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) เป็นเครื่องหมายแรกที่ได้มีการพัฒนาขึ้น เป็นการอาศัยหลักการทำงานของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องหมาย RAPD SSR และ ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR: polymerase chain reaction) นอกจากนี้ ยังมีเครื่องหมาย AFLP เป็นการผสมผสานการทำงานระหว่างเอ็นไซม์ตัดจำเพาะกับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกัน เป็นต้น เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนของปาล์มน้ำมันได้แก่เครื่องหมาย RAPD (Moretzsohn *et al*., 2000; Moretzsohn *et al*., 2002; สายชล, 2547) RFLP (Maizura *et al*., 2006) และ SSR (Billotte *et al*., 2005) โดยที่เครื่องหมาย RAPD ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลจำนวนมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ได้ง่ายและรวดเร็ว (Williams *et al*., 1990) แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งผลที่ได้ต่างจากเดิม เนื่องจาก RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ (สุรินทร์, 2545)

4.3.1 เทคนิค PCR

การทำเทคนิค PCR โดยทั่วไปใช้เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในการศึกษา โดยใช้หลักการเดียวกับการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอ็นไซม์กลุ่ม DNA polymerase เป็นตัวช่วยในการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ซึ่งจะเลือกจับนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งจาก 4 ชนิด นิวคลีโอไทด์ อันได้แก่ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP มาต่อเข้าเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ (template) ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ เอนไซม์ DNA polymerase นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด ไพรเมอร์ (primer) และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

ก. Denaturation เป็นการทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 90 - 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 วินาที อย่างไรก็ตามหากใช้อุณหภูมิสูงและเวลานานเกินไปจะทำให้เอนไซม์และนิวคลีโอไทด์สูญเสียสภาพได้ หากใช้อุณหภูมิต่ำและเวลาน้อยเกินไปจะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันไม่ดีส่งผลให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอลดลง

ข. Annealing ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันกับดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่แยกเป็นสายเดี่ยว ใช้อุณหภูมิประมาณ 40 - 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที การเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับคู่ให้จำเพาะมากขึ้น

ค. Extention เอ็นไซม์ DNA polymerase สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ที่เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายจนกระทั่งได้ดีเอ็นเอคู่ใหม่ ในขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

หากพิจารณาถึงจำนวนของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นโดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 ได้จำนวนสายดีเอ็นเอ 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้ซ้ำหลายๆ รอบ ดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในแต่ละรอบ มีลักษณะแบบทวีคูณ (2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา)

4.3.2 **เทคนิค** RAPD

RAPD เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการทำงานของพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ เพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) ซึ่งไม่จำเพาะกับยีนใดยีนหนึ่ง แล้วนำมาแยกขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เทคนิค RAPD ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยประมาณ 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา (Winter and Kahl, 1995) แต่เทคนิคนี้เป็น dominant marker ซึ่งแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จึงทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์แท้และพันธุ์ทางได้ (Cipriani *et al.,* 1996) นอกจากนี้ ยังมีข้อจำกัดในการทดลองซ้ำ ซึ่งบางครั้งได้ผลที่แตกต่างไปจากเดิม เนื่องจาก RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ สูง จึงต้องควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่

Rival และคณะ (1998) ได้ใช้ไพรเมอร์ของเทคนิค RAPD จำนวน 387 ไพรเมอร์ ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากต้นปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า มี 73 ไพรเมอร์ สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบพันธุกรรมระหว่างต้นแม่กับลูกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส สายชล (2547) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันทั้ง 3 แบบ ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย คือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอราด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPB-08 OPR-11 OPT-06 0PT-19 0PAB-01 OPAB-09 และ OPAB-14 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์และแถบดีเอ็นเอชัดเจน โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 209 แถบ เฉลี่ย 29.85 แถบต่อไพรเมอร์ และเมื่อนำมาสร้างเดนโดรแกรมเพื่อหาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) จากโปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) พบว่า ปาล์มน้ำมันที่ปลูกในแถบภาคใต้ของประเทศไทยมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของแคลลัสที่มีความเหมาะสมต่อการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น
2. เพื่อศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น
3. เพื่อศึกษาสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต แหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น
4. เพื่อศึกษาเทคนิคการผลิตเมล็ดเทียม
5. เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

บทที่ 2

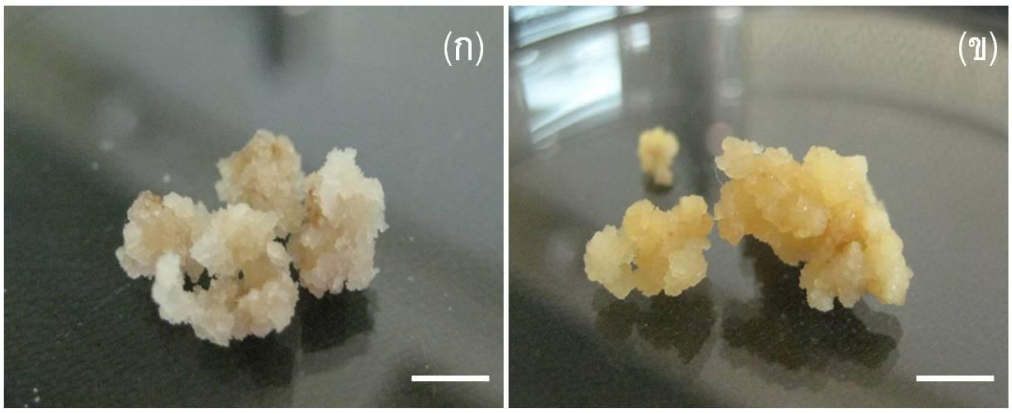
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุพืช

1.1 การศึกษาการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น

ใช้แคลลัสเริ่มต้นและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของปาล์มน้ำมันต้นโตพันธุ์เทเนอราอายุ 10 ปี จากสถานีวิจัยและฝึกภาคสนามเทพา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 ปี จากบริษัทเอกชน บนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และย้ายเลี้ยงทุก ๆ 15 วัน เป็นเวลา 60 วัน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แคลลัสที่ใช้ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)
ก: แคลลัสเริ่มต้น ข: เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

1.2 **การผลิตเมล็ดเทียม**

ใช้โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นและโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 จากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่เติมซอร์บิทอลขนาดและระยะการพัฒนาต่างๆ ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันโคลนที่ตอบสนองดีที่สุด เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งหรือในอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมที่สุด

1.3 **การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค** RAPD

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เซลล์ซัสเพนชั่นจากการทดลองที่ 2.2 และใบอ่อนจากยอดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 ปี ที่ได้จากการชักนำการงอกจากการทดลองที่ 4.1

2. **สารเคมี**

2.1 **สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน**

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS MSMo และ Y_3 (รายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 1)
- กรดแอสคอร์บิค
- คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแอลกอฮอล์ 2 ชนิด คือ แมนนิทอลและซอร์บิทอล
- อะดีนีนซัลเฟต อาร์จินิน แอสพาราจีนและกรดกลูตามิก
- สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (ไดแคมบา 2,4-D และ NAA)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน (BA KN 2iP และ TDZ)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ ได้แก่ ABA GA_3 และ PBZ
- สารเคมีที่ใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมประกอบด้วย โซเดียมแอลจิเนต แคลเซียมคลอไรด์และแคลเซียมไนเตรท
- แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

2.2 **สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ**

- กรดโซเดียมเอธิลีนไดอะมินเทตราอะซิติก
- คลอโรฟอร์ม
- โซเดียมคลอไรด์
- โซเดียมไดดิซิลซัลเฟต
- ทริส-กรดไฮโดรคลอริค
- พอลีไวนิลไพโรลิโดน 40 (PVP-40)
- เมอร์แคบโตเอธานอล
- เอธานอล
- แอมโมเนียมอะซิเตต
- ไอโซโพรพานอล
- เฮกซะเดคิลไตรเมธิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)

2.3 **สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส**

- 100 bp DNA Ladder (Operon, USA)
- Loading buffer
- กรดบอริค
- กรดอะซิติก
- ซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
- โซเดียมไทโอซัลเฟท ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)
- ทริสเบส
- เทมเมด (N,N,N',N'-tetramethyethyenediamine)
- ไบนด์ไซเลน
- โพลีอะคริลาไมด์ : bis-acrylamide solution (29:1)
- โพลีอะคริลาไมด์เจล
- ฟอร์มาไมด์
- ฟอร์มาลดีไฮด์
- ยูเรีย
- เรเพล

- แลมด้าดีเอ็นเอ (λ DNA)
- อะกาโรสเจล
- เอธิเดียมโบรไมด์แอมโมเนียมเพอซัลเฟท

2.4 **สารเคมีที่ใช้ในการทำ** PCR

- dNTP (dATP dTTP dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- Primer RAPD จากบริษัท Operon Tech. (USA)
  (รายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 2)
- Primer SSR จากบริษัท Operon Tech. (USA)
  (รายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 3)
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)
- 10X *Taq* buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA)

3. **อุปกรณ์การทดลอง**

3.1 **อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร**

- เครื่องแก้ว ประกอบด้วย กระบอกตวง ปิเปต บีกเกอร์ จานเพาะเลี้ยง ขวดปรับปริมาตร ขวดเพาะเลี้ยง ขวดรูปชมพู่และหลอดทดลอง เครื่องกรองจุลินทรีย์
- กระดาษกรองจุลินทรีย์ขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก
- ตู้อบฆ่าเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบแห้ง ไมโครเวฟ และตู้เย็น
- ไมโครปิเปต กระดาษชำระ

3.2 **เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง**

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ปากคีบ ใบมีดผ่าตัดพร้อมด้าม

- ปิเปตปลายตัดขนาด 5 มิลลิลิตร
- เครื่องเขย่า ชั้นวางเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิ
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เต็ด และกล้องถ่ายรูปรูปดิจิตอล

3.3 **อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสและการทำ** PCR

- ตู้เย็น ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส และถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
- เครื่องไมโครเซ็นตริฟิวจ์
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องคนละลายสารอัตโนมัติ
- เครื่องปั่นผสมสาร
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า (vortex)
- เครื่อง XP Thermal Cycler (บริษัท Bioer Technology จำกัด รุ่น TC-XP ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- ตู้อบไมโครเวฟ
- หลอดเอฟเพนดอร์ฟขนาด 15 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต และทิป
- น้ำแข็ง และกระติกน้ำแข็ง
- แท่งแก้วสำหรับบดตัวอย่าง เครื่องแก้ว กระบอกตวง และขวดต่าง ๆ

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

1.1 การศึกษาการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น

ใช้แคลลัสเริ่มต้นและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 15 วัน หลังจากย้ายเลี้ยงครั้งสุดท้าย ปริมาณ 0.25 กรัมน้ำหนักสด มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS หรือ Y_3 เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ ไดแคมบา NAA หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.7 เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ ย้ายเลี้ยงทุกๆ เดือนเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่นที่ชักนำได้ในแต่ละสูตรอาหาร

1.2 การศึกษาการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

ใช้เซลล์ซัสเพนชั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรตะกอนเซลล์ (Packed cell volume: PCV) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS หรือ MSMo (รายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 1) เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมไดแคมบา NAA หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ ย้ายเลี้ยงทุกๆ เดือน เป็นเวลา 3 เดือน หลังจากนั้น ตรวจสอบการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์หลังจากการวางเลี้ยงทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่นในแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ completely ramdomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

2. การศึกษาการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

2.1 การศึกษาผลของปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

ใช้ตะกอนเซลล์เริ่มต้นปริมาตร 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อหาปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRDเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

ใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 5 7 หรือ 9 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบ ต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 30 วัน ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่นในแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.3 การศึกษาความถี่ในการย้ายเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

ใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 2.2 วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุกๆ 15 21 หรือ 30 วัน เป็นเวลา 4 เดือน ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ หลังจากนั้น บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่นในแต่ละช่วงเวลาการย้ายเลี้ยง เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.4 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

ใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 2.2 ร่วมกับการเติมสารอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ (อะดีนีนซัลเฟต อาร์จินิน แอสพาราจีนและกรดกลูตามิก) ที่ความเข้มข้น 10 20 30 หรือ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 30 วัน ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่นในแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.5 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

ใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารแอมโมเนียมไนเตรทและโปรแตสเซียมไนเตรทเป็น

1/8 1/4 1/2 หรือ 1 เท่า เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 2.2 วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 30 วัน ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่นในแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. การศึกษาการเจริญและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของไดแคมบาต่อการเจริญและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

ใช้เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 2.2 วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุกๆ 30 วัน เป็นเวลา 3 เดือน ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่น อัตราการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้ในแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3.2 การศึกษาผลของผงถ่านต่อการเจริญและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

ใช้เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 2.2 ร่วมกับการเติมผงถ่านเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตาราง

เมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุกๆ 30 วัน เป็นเวลา 3 เดือน ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่น อัตราการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้ในแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3.3 การศึกษาผลของน้ำตาลแอลกอฮอร์ต่อการเจริญและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

ใช้เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม ไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซอร์บิทอลหรือแมนนิทอลความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 หรือ 0.4 โมลาร์ ร่วมกับการเติมหรือไม่เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุกๆ 30 วัน เป็นเวลา 6 เดือน ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ บันทึกลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่น อัตราการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้ในแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4. การศึกษาการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

4.1 การศึกษาความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อความสามารถในการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

ใช้โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการทดลองที่ 3 ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1/2 หรือ MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 4 เดือน ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด บันทึกอัตราการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารแข็งหรือเหลวแบบชั่วคราวต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1

ใช้โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการทดลองที่ 3.3 ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งหรือในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA KN TDZ ABA GA_3 หรือพาโคลบิวทาโซลความเข้มข้น 0.01 0.05 0.1 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 2 3 หรือ 4 สัปดาห์ หลังจากนั้น นำโซมาติกเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 เดือน ในอาหารเหลวทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ฟลาสก์ บนอาหารแข็งทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด บันทึกอัตราการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 ในแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

5. การศึกษาการผลิตเมล็ดเทียม

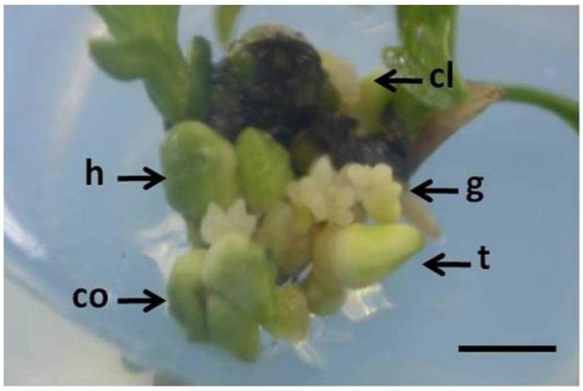
5.1 การศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมโดยโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1

ใช้โซมาติกเอ็มบริโอขนาด 1 2 และ 3 มิลลิเมตร มาห่อหุ้มด้วยสารละลายอาหารสูตร MS ที่ปราศจากแคลเซียมคลอไรด์เติมโซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 2 2.5 หรือ 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ดูดเอ็มบริโอด้วยปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์หรือแคลเซียมไนเตรทความเข้มข้น 100 หรือ 150 มิลลิโมลาร์ ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 15 หรือ 30 นาที เมื่อได้เมล็ดเทียมแล้วล้างด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้น ทำการเพาะบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 6 เดือน บันทึกอัตราการพัฒนา

หรืองอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้รับการห่อหุ้มและไม่ได้รับการห่อหุ้ม เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

5.2 การศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมโดยโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2

ใช้โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (Secondary Somatic Embryo: SSE) ระยะต่างๆ ได้แก่ กลม ทอร์ปิโด สร้างจาว สร้างใบเลี้ยงหรือกลุ่มก้อนของ SSE ระยะรูปกลม (ภาพที่ 7) นำมาห่อหุ้มด้วยสารละลายอาหารสูตร MS ที่ปราศจากแคลเซียมคลอไรด์เติมโซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 2 2.5 หรือ 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ดูดเอ็มบริโอด้วยปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์หรือแคลเซียมไนเตรทความเข้มข้น 100 หรือ 150 มิลลิโมลาร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 หรือ 30 นาที เมื่อได้เมล็ดเทียมแล้วล้างด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้น ทำการเพาะบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 6 เดือน บันทึกอัตราการพัฒนาหรืองอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้รับการห่อหุ้มและไม่ได้รับการห่อหุ้ม เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 7 โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (SSE) ระยะต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตเมล็ดเทียม ได้แก่ กลม: g ทอร์ปิโด: t สร้างจาว: h สร้างใบเลี้ยง: co และกลุ่มก้อนของ SSE ระยะรูปกลม: cl (บาร์เท่ากับ 5 มิลลิเมตร)

6. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เซลล์ซัสเพนชั่นและใบอ่อนของต้นกล้าที่ผลิตได้จากการชักนำการงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่น โดยนำตัวอย่างประมาณ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักสดมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้และเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR หลังจากนั้นจึงตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอ

6.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชั่น

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato (2000) โดยเก็บตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชั่นปริมาณ 50 มิลลิกรัมน้ำหนักสด ใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TE บัฟเฟอร์ (Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และโซเดียมไดดิซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 110 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อเห็นสายดีเอ็นเอแล้ววางไว้หรือนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0.5 - 1 นาที จากนั้นเทไอโซโพรพานอลทิ้ง ล้างด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เทเอธานอลทิ้ง ผึ่งให้แห้ง หลังจากนั้นเติม TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

6.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อน

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ดัดแปลงโดยเติมโพลีไวนิลไพโรลิโดน 40 (PVP-40) 10 มิลลิกรัม โดยนำตัวอย่างใบอ่อนประมาณ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักสดบดในบัฟเฟอร์ CTAB ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในโกร่งให้ละเอียดใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 800 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายที่แยกชั้นใสส่วนบนดูดสารละลายเฉพาะส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ หลังจากนั้นจึงเติมไอโซโพรพานอล 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอหรือวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ที่ผ่านการแช่เย็นจำนวน 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE บัฟเฟอร์ 70 ไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

6.3 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอขนาด 40 และ 80 นาโนกรัม) โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจลอะกาโรส (LE Agarose, Promega,USA) เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0) เป็นเวลาประมาณ 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 - 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 - 10 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation

6.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เทคนิค RAPD เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากหัวข้อ 6.1 โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการที่รายงานโดยสายชล (2547) ปฏิกิริยาดังกล่าวประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ คือ OPA-03 OPA-19 OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPB-08 OPJ-04 OPN-15 OPR-11 และ OPT-06 แต่ละไพรเมอร์ใช้ความเข้มข้นละ 0.3 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.50 ไมโครลิตร 10X บัฟเฟอร์ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTP) เข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Tag* polymerase เข้มข้น 1.5 ยูนิต ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 17.75 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

1. Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

2. Denaturation ใช้อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

3. Annealing ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

4. Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2 - 4 ทำซ้ำ 39 รอบ

5. Final-Extention ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อีก 1 รอบ

ในกรณีของเทคนิค SSR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามรายงานของ Thawaro (2009) และสกุลรัตน์ (2553) ด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ ที่เป็น forward และ reverse ทั้งหมด 9 คู่ ไพรเมอร์ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 ปฏิกิริยาดังกล่าวประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 20 นาโนกรัม ปริมาตร 1.8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละคู่เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10X บัฟเฟอร์ ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 0.5 ยูนิต ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 4.1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

1. Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

2. Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

3. Annealing ใช้อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

4. Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำ 35 รอบ

5. Final-Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที

6.5 การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

6.5.1 เทคนิค RAPD

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคPCRมาแยกขนาดดีเอ็นเอ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจลอะกาโรส เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE บัฟเฟอร์ (Tris Base 0.45 โมลาร์ Boric acid 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0)

แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ นำแผ่นเจลตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation บันทึกภาพเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างดีเอ็นเอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

6.5.2 **เทคนิค** SSR

หลังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคPCR นำดีเอ็นเอปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่จะนำไปวิเคราะห์มาทำให้เสียสภาพก่อน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการเสียสภาพธรรมชาติในเวลาต่างกันเมื่ออยู่ในเจล โดยผสมกับฟอร์มาไมด์ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบใน loading buffer นำไปเพิ่มปริมาณที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยการทำอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้เจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย fixative (acetic acid 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบา ๆ ล้างในน้ำกลั่น 20 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่แล้วล้างต่ออีก 10 นาที นำแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ ก่อนนำแผ่นเจลจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว (5 วินาที) เพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรตที่มากเกินพอออก แล้วนำแผ่นเจลใส่ในสารละลาย developer (sodium carbonate 25 เปอร์เซ็นต์ แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส formaldehyde 40 เปอร์เซ็นต์ sodium thiosulfate 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เขย่าความเร็วสม่ำเสมอ จนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยแช่แผ่นเจลในสารละลายกรดอะซิติก (stop solution) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอที่ปรากฏเพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

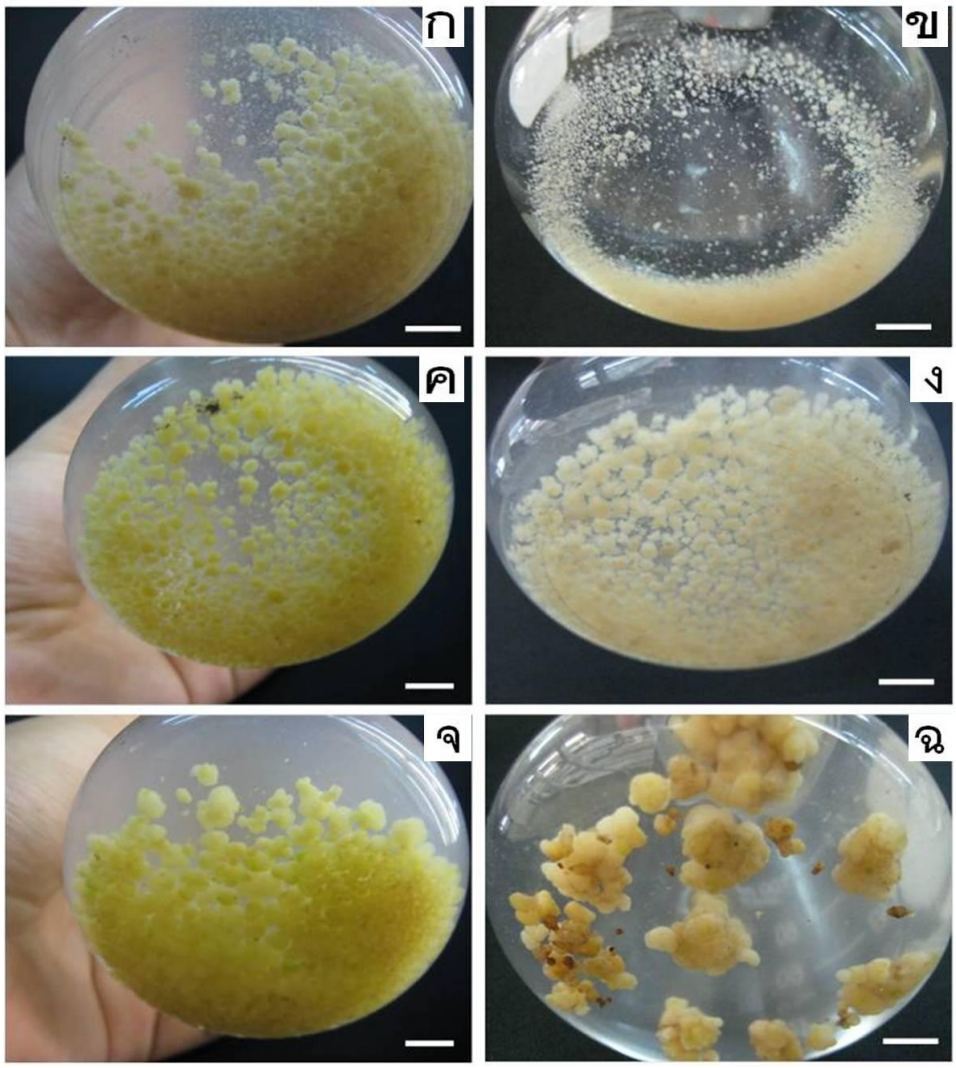
บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

1.1 ผลของชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารต่อการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น

ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นคือเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโต ย้ายเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มีแสงเป็นเวลา 3 เดือน ให้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1-3 มิลลิเมตร บวมน้ำและมีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 8ก) สำหรับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากปาล์มน้ำมันต้นโตที่ย้ายเลี้ยงลงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D หรือ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้กลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 4 มิลลิเมตร (ภาพที่ 8ค และ 8จ) ในกรณีของแคลลัสเริ่มต้นที่ชักนำจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโต ที่ย้ายเลี้ยงลงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D และไดแคมบาให้กลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 มิลลิเมตร ในขณะที่ แคลลัสเริ่มต้นที่ชักนำจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตย้ายเลี้ยงลงในอาหารสูตร MS เติม NAA ให้เซลล์ซัสเพนชั่นที่มีลักษณะคล้ายราก มีการเพิ่มปริมาณเร็วเหมือนกับเซลล์ซัสเพนชั่นที่ชักนำได้จากการวางเลี้ยงแคลลัสเริ่มต้นและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ชักนำจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อย่างไรก็ตาม แคลลัสทุกประเภทที่ย้ายเลี้ยงลงอาหารสูตร Y_3 พบว่า เซลล์ในซัสเพนชั่นหยุดชะงักการเจริญหรือชีดตายในที่สุด (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 8 ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นที่ชักนำได้จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันต้นโตเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับออกซินชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลาต่างๆ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

ก: ไดแคมบา หลังจากวางเลี้ยง 3 เดือน ข: ไดแคมบา หลังจากวางเลี้ยง 6 เดือน

ค: 2,4-D หลังจากวางเลี้ยง 3 เดือน ง: 2,4-D หลังจากวางเลี้ยง 6 เดือน

จ: NAA หลังจากวางเลี้ยง 3 เดือน ฉ: NAA หลังจากวางเลี้ยง 6 เดือน

ตารางที่ 2 ผลของชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารต่อการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น เมื่อวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มีแสงเป็นเวลา 3 เดือน

ชิ้นส่วนพืช	สูตรอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโต	ลักษณะของซัสเพนชั่น
แคลลัสเริ่มต้นจากต้นกล้า	MS	ไดแคมบา	กลุ่มก้อนขนาดใหญ่บวมน้ำและมีลักษณะคล้ายรากการเพิ่มปริมาณเร็ว
		2,4-D	กลุ่มก้อนขนาดใหญ่บวมน้ำและมีลักษณะคล้ายรากการเพิ่มปริมาณช้า
		NAA	ลักษณะคล้ายรากการเพิ่มปริมาณเร็ว
	Y_3	ไดแคมบา	ไม่เปลี่ยนแปลง
		2,4-D	เปลี่ยนเป็นสีขาวซีด
		NAA	เปลี่ยนเป็นสีขาวซีด
เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากต้นกล้า	MS	ไดแคมบา	กลุ่มก้อนขนาดใหญ่บวมน้ำและมีลักษณะคล้ายรากการเพิ่มปริมาณเร็ว
		2,4-D	กลุ่มก้อนขนาดใหญ่บวมน้ำและมีลักษณะคล้ายรากการเพิ่มปริมาณเร็ว
		NAA	ลักษณะคล้ายรากการเพิ่มปริมาณเร็ว
	Y_3	ไดแคมบา	ไม่เปลี่ยนแปลง
		2,4-D	ไม่เปลี่ยนแปลง
		NAA	เปลี่ยนเป็นสีขาวซีด
แคลลัสเริ่มต้นจากต้นโต	MS	ไดแคมบา	กลุ่มก้อนขนาดใหญ่บวมน้ำการเพิ่มปริมาณเร็ว
		2,4-D	กลุ่มก้อนขนาดใหญ่บวมน้ำการเพิ่มปริมาณเร็ว
		NAA	ลักษณะคล้ายรากการเพิ่มปริมาณเร็ว
	Y_3	ไดแคมบา	ไม่เปลี่ยนแปลง
		2,4-D	เปลี่ยนเป็นสีขาวซีด
		NAA	เปลี่ยนเป็นสีขาวซีด
embryogenic callus จากต้นโต	MS	ไดแคมบา	กลุ่มก้อนขนาดเล็กบวมน้ำการเพิ่มปริมาณเร็ว
		2,4-D	กลุ่มก้อนขนาดใหญ่บวมน้ำการเพิ่มปริมาณเร็ว
		NAA	กลุ่มก้อนขนาดใหญ่บวมน้ำการเพิ่มปริมาณเร็ว
	Y_3	ไดแคมบา	ไม่เปลี่ยนแปลง
		2,4-D	ไม่เปลี่ยนแปลง
		NAA	เปลี่ยนเป็นสีขาวซีด

1.2 การเพิ่มปริมาณของเซลล์ซัสเพนชั่น

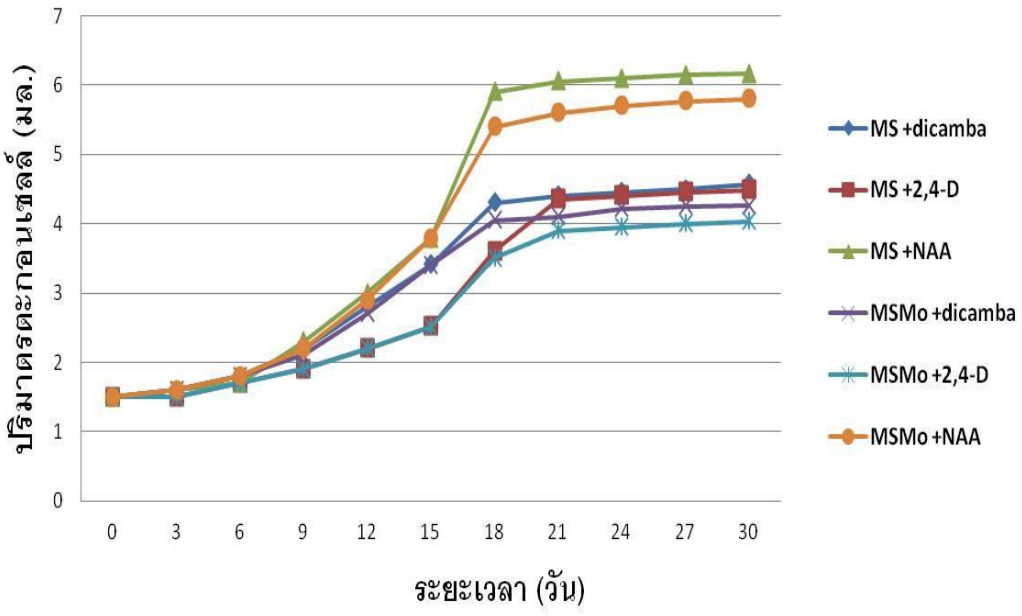
การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเริ่มแรกลงในอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 6.16 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน อย่างไรก็ตาม ลักษณะของเซลล์ที่ได้เป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร และบวมน้ำ (ภาพที่ 8ฉ) แตกต่างจากการย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเริ่มแรกลงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงรองลงมาที่ 4.57 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงที่ระยะเวลาเดียวกัน (ตารางที่ 3 และภาพที่ 9) และลักษณะเซลล์ที่ได้เป็นกลุ่มก้อนขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ซัสเพนชั่นเริ่มต้นด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 8ข) สำหรับการย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเริ่มแรกลงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เท่ากับ 4.49 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงที่ระยะเวลาเดียวกัน แต่ลักษณะเซลล์ที่ได้เป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่กว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมไดแคมบา (ภาพที่ 8ง) ในกรณีของการย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเริ่มแรกลงในอาหารสูตร MSMo เติมออกซินชนิดต่าง ๆ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เป็นไปในทำนองเดียวกับที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS คือ NAA ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 5.8 มิลลิลิตร รองลงมาคือไดแคมบาและ 2,4-D ให้ที่ 4.255 และ 4.035 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน แต่ขนาดของกลุ่มก้อนของเซลล์ในซัสเพนชั่นมีขนาดใหญ่กว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS

ตารางที่ 3 ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากวางเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างๆ

สูตรอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโต	ปริมาตรตะกอนเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง (มล.)	
		15 วัน	30 วัน
MS	ไดแคมบา	3.41a	4.57b
	2,4-D	2.52b	4.49b
	NAA	3.79a	6.16a
MSMo	ไดแคมบา	3.405a	4.255b
	2,4-D	2.515b	4.035b
	NAA	3.785a	5.8a
F-test		**	**
C.V.(%)		29.96	37.15

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 9 ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

2. การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

2.1 ผลของปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นด้วยปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 1.5 มิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 5.36 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน รองลงมา คือ การย้ายเลี้ยงตะกอนเซลล์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นที่ 3.61 มิลลิลิตร (ตารางที่ 4 และภาพที่ 10) หากคิดเป็นจำนวนเท่าของปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจากปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น พบว่า การย้ายเลี้ยงปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นที่ 1.0 มิลลิลิตร ให้อัตราการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ 3.61 เท่า สูงกว่าการใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นที่ 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งให้อัตราการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์เท่ากับ 3.57 เท่า สำหรับการย้ายเลี้ยงตะกอนเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ส่งผลให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ต่ำสุดที่ 1.65 มิลลิลิตร และอัตราการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ที่ 3.3 เท่า

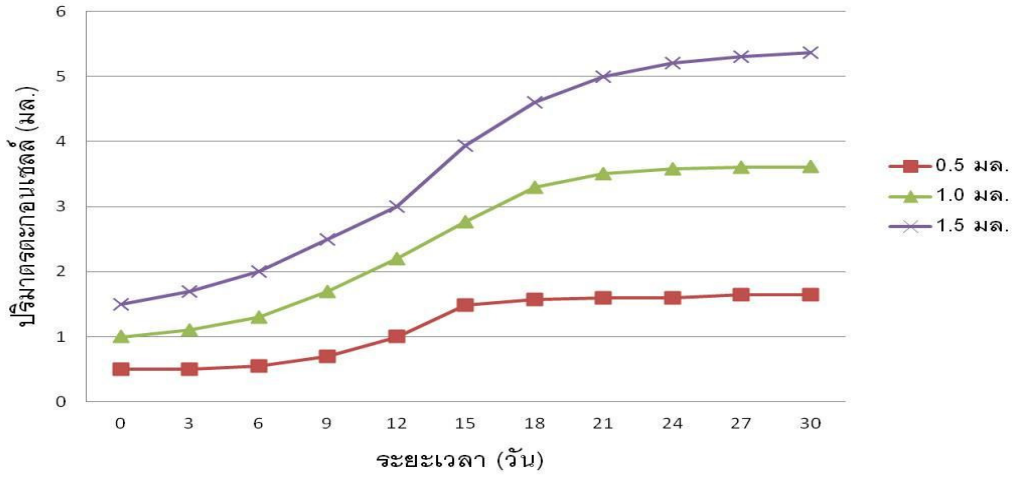
ตารางที่ 4 ผลของปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่างๆ

ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น (มล.)	ปริมาตรตะกอนเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง (มล.)	
	15 วัน	30 วัน
0.5	1.49c (1.49)	1.65c (3.30)
1.0	2.77b (2.77)	3.61b (3.61)
1.5	3.94a (2.63)	5.36a (3.57)
F-test	**	**
C.V.	35.80	51.06

ตัวเลขในวงเล็บคือ อัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาตรตะกอนเซลล์ (เท่า)

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 10 ผลของปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน

2.2 ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

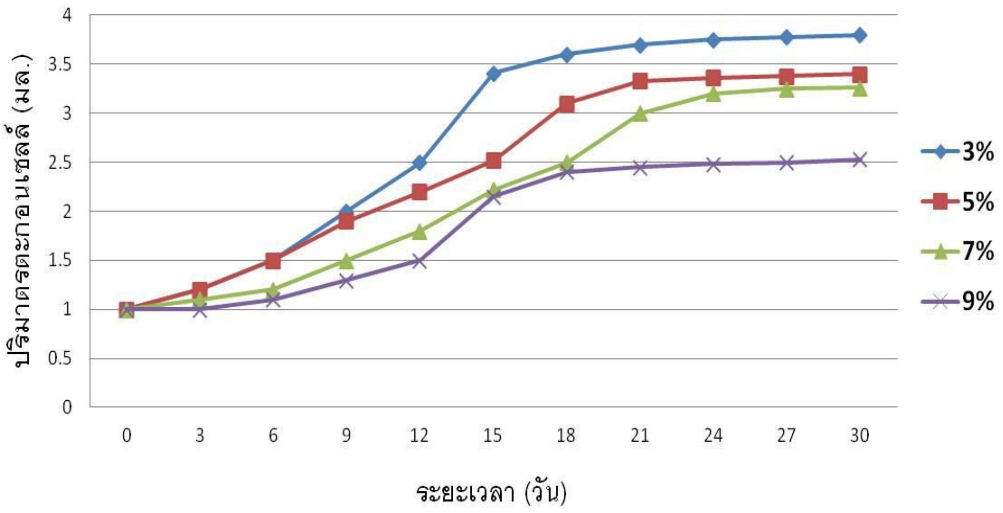
การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 3.8 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่ 5 และภาพที่ 11) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันเติมน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ (3.4 มิลลิลิตร) อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการศึกษาลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 7 และ 9 เปอร์เซ็นต์ มีการสะสมของเม็ดแป้งภายในเซลล์ (ภาพที่ 12ค และ 12ง) แตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มีการสะสมเม็ดแป้งภายในเซลล์ (รูปที 12ก และ 12ข)

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

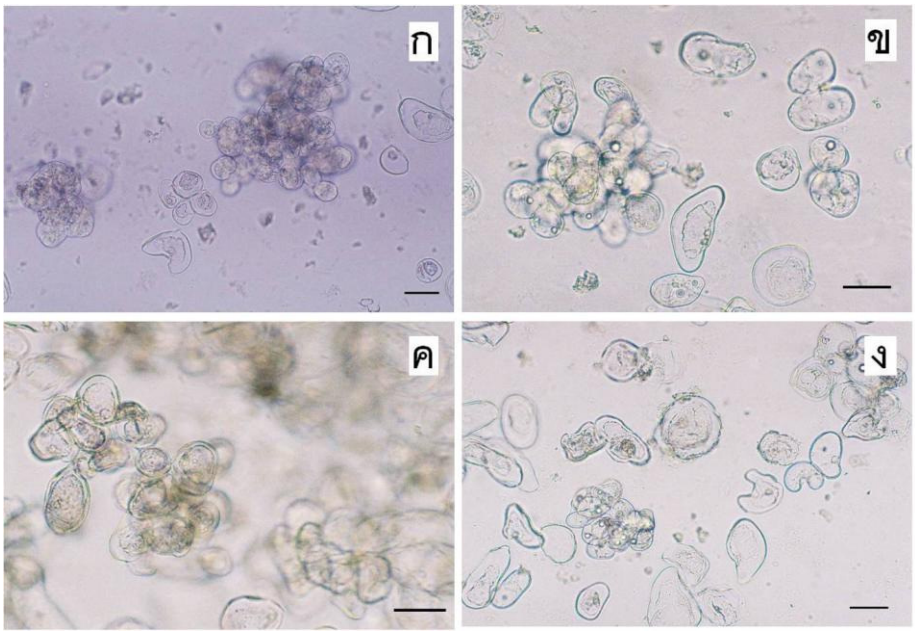
ความเข้มข้นของน้ำตาล	ปริมาตรตะกอนเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง (มล.)	
	15 วัน	30 วัน
3%	3.41a	3.8a
5%	2.52b	3.4a
7%	2.22b	3.26ab
9%	2.15b	2.53b
F-test	**	**
C.V. (%)	29.96	36.57

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 11 ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน



ภาพที่ 12 ลักษณะของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน (บาร์เท่ากับ 50 ไมโครเมตร)

ก: 3% ข: 5%

ค: 7% ง: 9%

2.3 ผลของความถี่ในการย้ายเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ความถี่ 15 วันต่อรอบการย้ายเลี้ยง ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 7.74 มิลลิลิตรต่อรอบการย้ายเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน รองลงมา คือ ที่ 21 วันต่อรอบการย้ายเลี้ยง ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เท่ากับ 6.72 มิลลิลิตร และที่ 30 วันต่อรอบการย้ายเลี้ยง ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เท่ากับ 4.01 มิลลิลิตร (ตารางที่ 6 และภาพที่ 13) เมื่อพิจารณาลักษณะของตะกอนเซลล์ พบว่า การย้ายเลี้ยงที่ความถี่ 15 และ 21 วันต่อรอบการย้ายเลี้ยง ให้

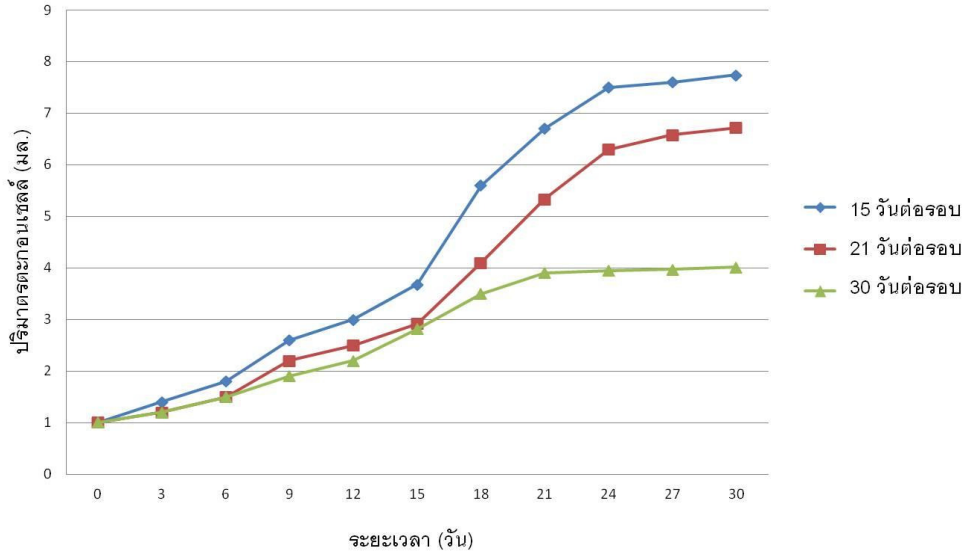
ตะกอนเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำและเมื่อทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีแวคิวโอลขนาดใหญ่และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า เซลล์มีอาการชีดและตายในที่สุด ในขณะที่ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยย้ายเลี้ยงทุกๆ 30 วัน มีการเจริญเติบโตตามปกติ ดังนั้นจึงใช้เวลาการย้ายเลี้ยงทุกๆ 30 วัน ในการเพาะเลี้ยงและการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันในครั้งนี้

ตารางที่ 6 ผลของความถี่ในการย้ายเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 เดือน

ความถี่ในการย้ายเลี้ยง	ปริมาตรตะกอนเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง (มล.)	
(วันต่อรอบ)	15 วัน	30 วัน
15	3.68a	7.74a
21	2.92ab	6.72b
30	2.82b	4.01c
F-test	**	**
C.V. (%)	22.28	20.40

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 13 ผลของความถี่ในการย้ายเลี้ยงต่อการเพิ่มของปริมาตรตะกอนเซลล์หลังจากวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 30 วัน

2.4 ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

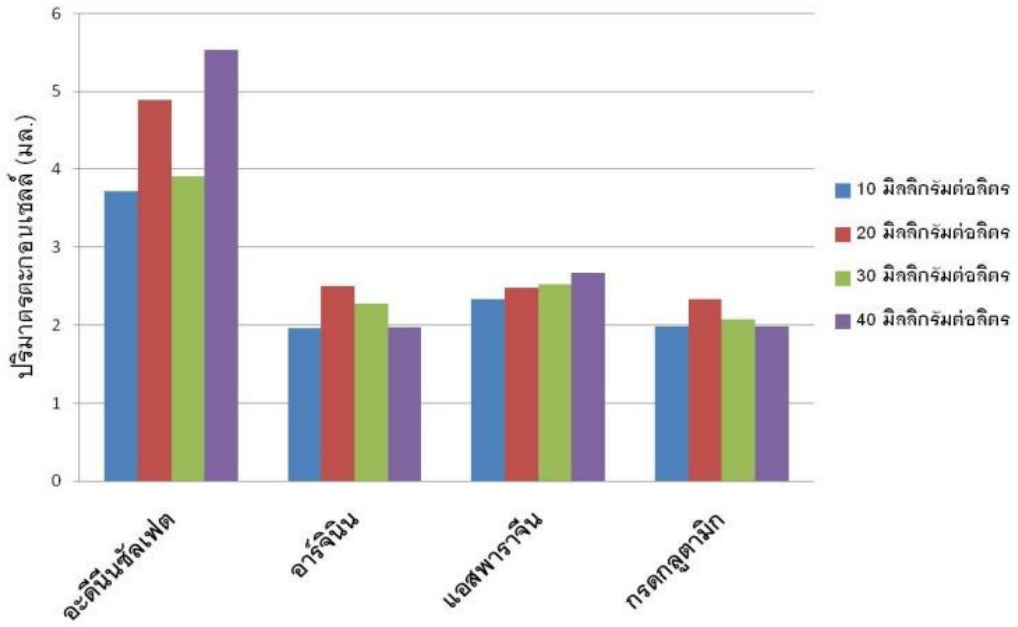
การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดีนีนซัลเฟตเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 5.53 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่ 7 และภาพที่ 14) มีความแตกต่างทางสถิติกับปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันเติมอะดีนีนซัลเฟตระดับความเข้มข้นอื่นๆ ในขณะที่ อินทรีย์ไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์น้อยกว่าชุดควบคุม (MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 4.01 มิลลิลิตร) นอกจากนี้ การศึกษาลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไม่มีการพัฒนาใดๆ เกิดขึ้นและหากเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า เซลล์เกิดอาการซีดและตายในที่สุด

ตารางที่ 7 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร)	
	15 วัน	30 วัน
ชุดควบคุม	2.82b	4.01b
อะดีนีนซัลเฟต		
10	2.62bc	3.72b
20	3.91a	4.89a
30	3.13a	3.91b
40	2.99b	5.53a
อาร์จินิน		
10	1.92cd	1.96c
20	2.4bcd	2.5c
30	2.4bcd	2.28c
40	1.92cd	1.97c
แอสพาราจีน		
10	1.83cd	2.33c
20	1.87cd	2.48c
30	1.87cd	2.52c
40	2.4bcd	2.67c
กรดกลูตามิก		
10	1.78bcd	1.98c
20	2.33bcd	2.33c
30	2.12bcd	2.07c
40	1.98cd	1.98c
F-test	**	**
C.V. (%)	26.26	44.97

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 14 ผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

2.5 ผลของความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของแอมโมเนียมไนเตรทและโปแตสเซียมไนเตรทเป็น 1/2 1/4 หรือ 1/8 เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้อัตราการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ต่ำกว่าในอาหารสูตรที่เติมธาตุไนโตรเจนในอัตราปกติ (ชุดควบคุมให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 4.01 มิลลิลิตร) โดยอาหารสูตรที่ลดองค์ประกอบของแอมโมเนียมไนเตรทและโปแตสเซียมไนเตรทเป็น 1/2 ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 2.66 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่ 8 และภาพที่ 15) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่ลดองค์ประกอบของแอมโมเนียมไนเตรทและโปแตสเซียมไนเตรทเป็น 1/4 หรือ 1/8 ซึ่งให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 2.19 และ 1.88 ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไม่มีการพัฒนาใดๆ เกิดขึ้น หากเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า เซลล์เกิดอาการซีดและตายในที่สุด

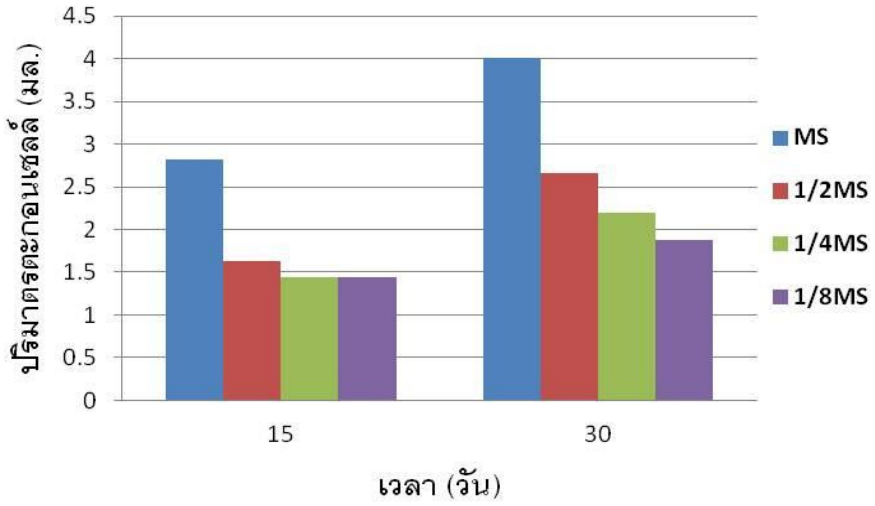
ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ความเข้มข้นของ NH_4NO_3 และ KNO_3 (เท่า)	ปริมาตรตะกอนเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	
	15 วัน	30 วัน
1	2.82a	4.01a
1/2	1.63b	2.66b
1/4	1.44b	2.19c
1/8	1.44b	1.88c
F-test	**	**
C.V. (%)	15.87	17.64

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 15 ผลของความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเพิ่มปริมาตรของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

3. การเจริญและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

3.1 ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาต่อการเจริญและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

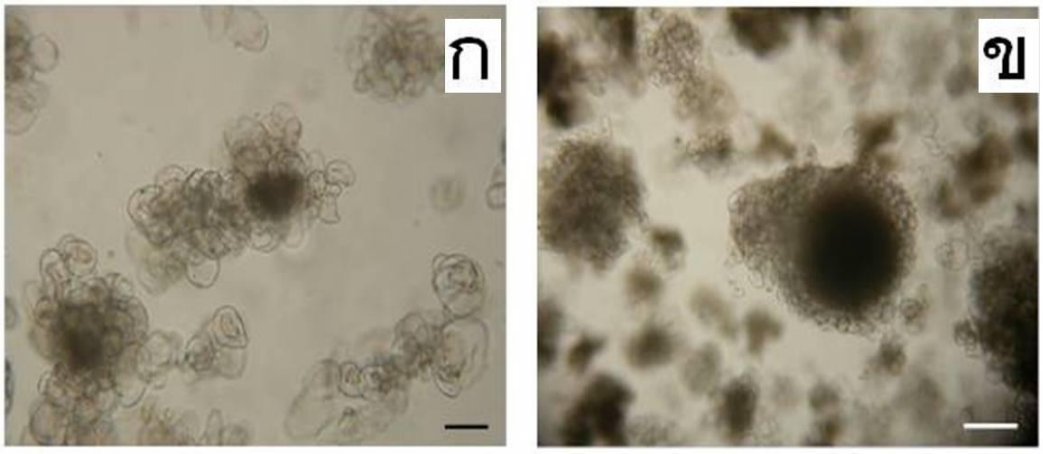
การลดความเข้มข้นของไดแคมบาส่งผลให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ลดลง ไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เท่ากับ 4.18 มิลลิลิตร เมื่อลดความเข้มข้นลงเป็น 0.75 0.5 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 3.7 2.65 และ 2.19 มิลลิลิตร ตามลำดับ อาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมไดแคมบาให้ปริมาตรตะกอนเซลล์น้อยสุดที่ 1.79 มิลลิลิตร แม้ว่าปริมาตรตะกอนเซลล์ลดลงก็ตาม การลดความเข้มข้นของไดแคมบาลงส่งเสริมการพัฒนาของเซลล์และการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารที่ลดความเข้มข้นของไดแคมบาเป็นเวลา 3 เดือน ส่งเสริมให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเพียง 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้ พบว่า อาหารสูตรที่ไม่เติมไดแคมบาให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดที่ 31.83 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ส่วนเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเพียง 1.92 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารสูตรเดิมต่อไปเป็นเวลาอีก 3 เดือน พบว่า ในสูตรอาหารที่ลดความเข้มข้นของไดแคมบาทุกสูตรส่งผลให้เซลล์และโซมาติกเอ็มบริโอตายทั้งหมด ส่วนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังคงส่งผลให้เซลล์ซัสเพนชั่นมีการเจริญเติบโตปกติและอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอค่อนข้างคงที่ (ตารางที่ 9) นอกจากนี้ เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ในทุกสูตรอาหารสามารถตรวจพบการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคเซลล์และกลุ่มของโปรเอ็มบริโอนิคเซลล์ (PEMs) ดังแสดงในภาพที่ 16

ตารางที่ 9 ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาต่อการเพิ่มปริมาณและพัฒนาการของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่างๆ

ไดแคมบา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อฟลาสก์	
			3 เดือน	6 เดือน
0	1.79c	100	31.83a	0b
0.25	2.19bc	100	31.17a	0b
0.5	2.65b	100	30.92a	0b
0.75	3.7a	100	7.17b	0b
1.0	4.18a	75	1.92c	2.17a
F-test	**		**	**
C.V.	20.14		18.07	45.71

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 16 ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 50 ไมโครเมตร)

ก: เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่น ข: กลุ่มของโปรเอ็มบริโอนิคเซลล์ (PEMs)

3.2 ผลของผงถ่านต่อการเจริญและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

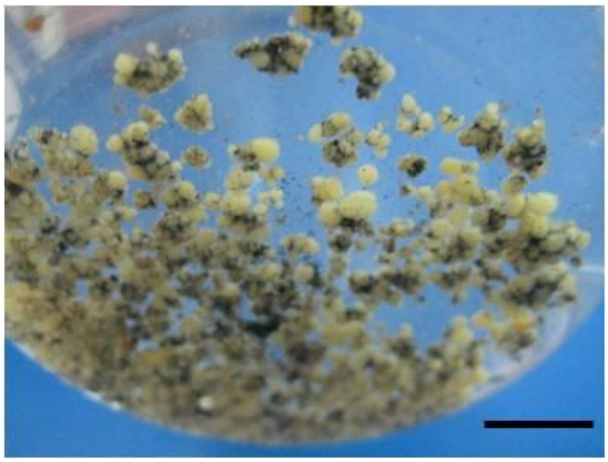
การลดความเข้มข้นของไดแคมบาร่วมกับการเติมผงถ่านส่งผลให้ระดับความเข้มข้นโดยรวมของไดแคมบาลดลงและดูดซับสารประกอบกลุ่มฟีโนลิค ทำให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ลดลงแต่ยังมีการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์มากกว่าการลดความเข้มข้นของไดแคมบาเพียงอย่างเดียว (การศึกษาที่ 3.1) จากไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เท่ากับ 4.18 มิลลิลิตร เป็น 4.43 มิลลิลิตร ที่ไดแคมบาเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ตะกอนเซลล์ที่ 3.87 มิลลิลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ตะกอนเซลล์ที่ 2.82 มิลลิลิตร และไดแคมบาเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ตะกอนเซลล์ที่ 2.11 มิลลิลิตร เมื่อไม่เติมไดแคมบาให้ตะกอนเซลล์ที่ 1.63 มิลลิลิตร (ตารางที่ 10) การเติมผงถ่านส่งเสริมการพัฒนาของเซลล์และการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส โดยทุกสูตรอาหารช่วยส่งเสริมให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่า ในทุกสูตรอาหารให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของไดแคมบาเพียงอย่างเดียว หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 6 เดือน พบว่า อาหารที่เติม ผงถ่านและลดความเข้มข้นของไดแคมบาช่วงระหว่าง 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เซลล์และ โซมาติกเอ็มบริโอตายทั้งหมด ส่วนอาหารเติมไดแคมบา 1 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่าน ส่งผลให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มสูงขึ้นเป็น 117.58 และ 94.17 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ตามลำดับ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 17)

ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาร่วมกับผงถ่านความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ไดแคมบา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อฟลาสก์	
			3 เดือน	6 เดือน
0	1.63c	100	36.83a	0c
0.25	2.11c	100	36.17a	0c
0.5	2.82b	100	34.25a	0c
0.75	3.87a	100	10.50b	94.17b
1.0	4.43a	100	8.67b	117.58a
F-test	**		**	**
C.V. (%)	20.03		24.01	44.49

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 17 โซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับผงถ่านเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 เดือน (บาร์เท่ากับ 1.0 เซนติเมตร)

3.3 ผลของน้ำตาลแอลกอฮอล์ต่อการเจริญและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

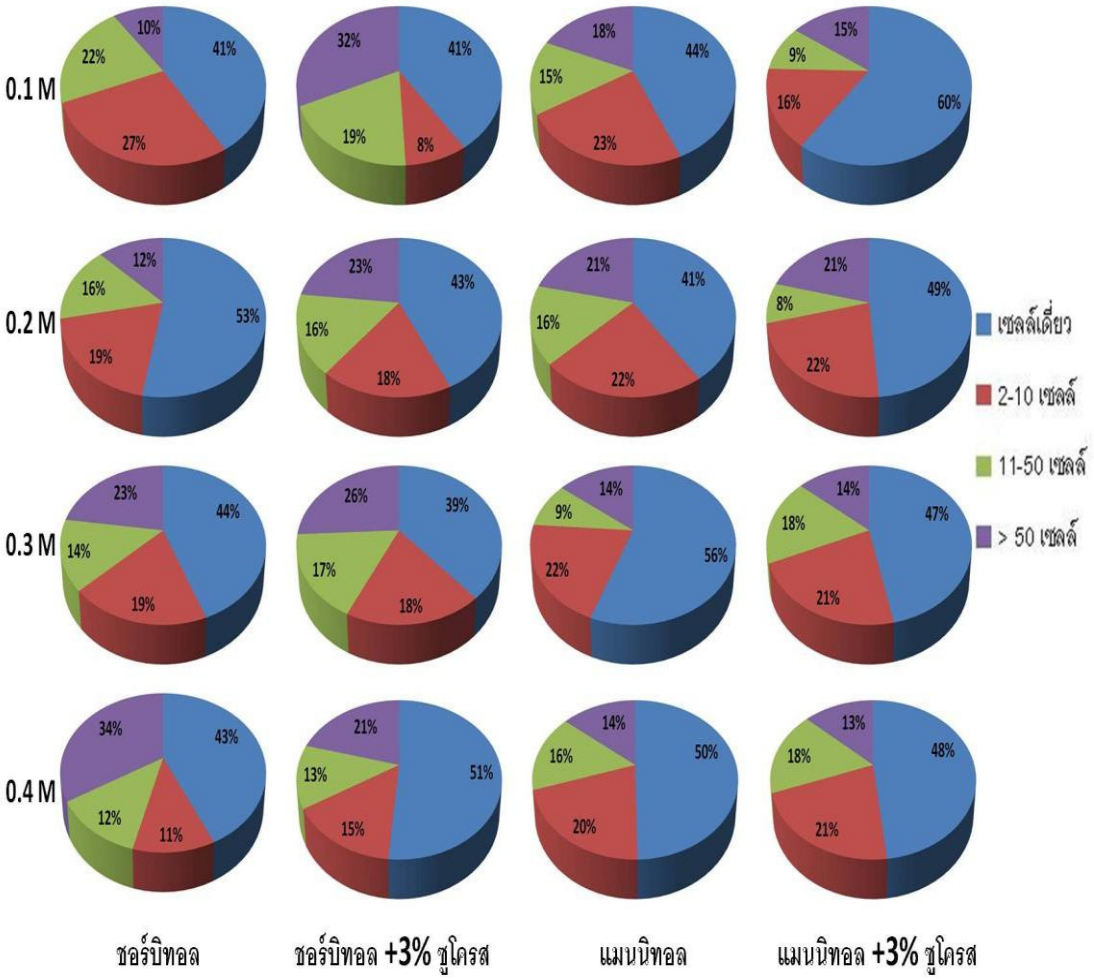
ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเติมน้ำตาลแอลกอฮอล์ ทุกชนิดและความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันโดยมีเซลล์เดี่ยวๆ เป็นจำนวนมากที่สุดระหว่าง 38.71 ถึง 59.58 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11และภาพที่ 18) เซลล์ซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเติมซอร์บิทอลความเข้มข้นต่ำ (0.1-0.2 โมลาร์) มีการเจริญเติบโตและพัฒนาให้กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (2-10 เซลล์) มากกว่าอาหารที่เติมซอร์บิทอลในความเข้มข้นสูง (ภาพที่ 18) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีการพัฒนาของกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก 27.32 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เพียงอย่างเดียว มีการพัฒนาของกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ (มากกว่า 50 เซลล์) ถึง 33.6 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 11 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแอลกอฮอล์ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ต่อลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่พัฒนาในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลแอลกอฮอล์ (โมลาร์)	ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นหลังจากการเพาะเลี้ยง (%)			
	เซลล์เดี่ยว	2-10 เซลล์	11-50 เซลล์	> 50 เซลล์
ชุดควบคุม (3% ซูโครส)	42.10ef	14.50cde	16.05abc	27.35bc
ซอร์บิทอล				
0.1	41.39ef	27.32a	21.73a	9.56h
0.2	52.72ab	19.05bcd	15.80bcd	12.43h
0.3	44.30def	18.62bcd	14.33bcde	22.76cd
0.4	43.13def	10.84de	12.42cde	33.60a
ซอร์บิทอล + 3% ซูโครส				
0.1	40.85ef	8.31e	18.86ab	31.98ab
0.2	43.10def	17.54bcd	16.09abc	23.27cd
0.3	38.71f	18.35bcd	17.15ab	25.80bc
0.4	51.39bc	14.95cde	12.87cde	20.79cdef
แมนนิทอล				
0.1	43.65def	22.74b	15.02bcd	18.59defg
0.2	40.68ef	22.01b	15.88bcd	21.43cde
0.3	55.65ab	20.50bc	9.40de	14.45efgh
0.4	49.70bcd	20.31bc	15.94bcd	14.05efgh
แมนนิทอล + 3% ซูโครส				
0.1	59.58a	15.88cde	9.51de	15.03efgh
0.2	48.74bcd	22.13b	8.22e	20.91cdef
0.3	46.77cde	21.68b	17.79ab	13.76fgh
0.4	48.18bcd	21.21bc	17.36ab	13.24gh
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	19.66	24.05	36.43	32.15

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 18 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแอลกอฮอล์ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ต่อลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่พัฒนาในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ภาพที่ 19 ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับการเติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

ก: กลุ่มเซลล์ขนาด 2-10 เซลล์ ข: กลุ่มเซลล์ขนาด 11-50 เซลล์

ค: กลุ่มเซลล์ขนาดมากกว่า 50 เซลล์

การทดสอบแหล่งของคาร์โบไฮเดรตต่อการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอเกิดขึ้นเร็วที่สุดในอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1-0.2 โมลาร์ ร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน (ตารางที่ 12) โซมาติกเอ็มบริโอมีอัตราการเกิดสูงสุด 91.81 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน รองลงมาคือ อาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 74.13 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอต่ำที่สุดในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เพียงอย่างเดียว ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 5.25 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ไม่มีการเกิดของโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารสูตรที่เติมแมนนิทอลเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับซูโครส

ตารางที่ 12 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแอลกอฮอล์ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ต่อการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่นหลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างๆ

ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลแอลกอฮอล์ (โมลาร์)	อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากทำการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างๆ (เดือน)			
	3	4	5	6
ชุดควบคุม (3% ซูโครส)	75a	75a	75a	75b
ซอร์บิทอล				
0.1	0d	2.81e	21.75d	29.00c
0.2	0d	5.19d	28.94c	30.19c
0.3	0d	0f	0f	5.50e
0.4	0d	0f	0f	5.25e
ซอร์บิทอล + 3% ซูโครส				
0.1	5.25c	9.06c	31.75b	74.13b
0.2	6.19b	30.44b	73.19a	91.81a
0.3	0d	0f	6.44e	10.69d
0.4	0d	0f	6.56e	9.31d
แมนนิทอล				
0.1	0d	0f	0f	0f
0.2	0d	0f	0f	0f
0.3	0d	0f	0f	0f
0.4	0d	0f	0f	0f
แมนนิทอล + 3% ซูโครส				
0.1	0d	0f	0f	0f
0.2	0d	0f	0f	0f
0.3	0d	0f	0f	0f
0.4	0d	0f	0f	0f
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	72.11	45.07	25.73	17.62

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 1-10 มิลลิเมตร ซึ่งส่วนใหญ่มีขนาด 1-3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 20) อาหารสูตรที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นต่ำให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอขนาดเล็กสูงกว่าในอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นสูง โดยอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร สูงสุด 76.9 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13 และภาพที่ 21) ส่วนอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอขนาดใหญ่กว่า 3 มิลลิเมตร สูงสุด 11.14 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีของอาหารที่เติมซอร์บิทอลเพียงอย่างเดียว พบว่า อาหารที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1-0.2 โมลาร์ ส่งผลให้โซมาติกเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.3-0.4 โมลาร์ ส่งเสริมการเจริญและพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก (ภาพที่ 22) สำหรับจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้ พบว่า อาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอล ร่วมกับซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงกว่า โดยอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดที่ 712.75 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ รองลงมาคือ อาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่ 657.17 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ในขณะที่ อาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เพียงอย่างเดียว ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่ำสุดที่ 127 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ (ตารางที่ 13)

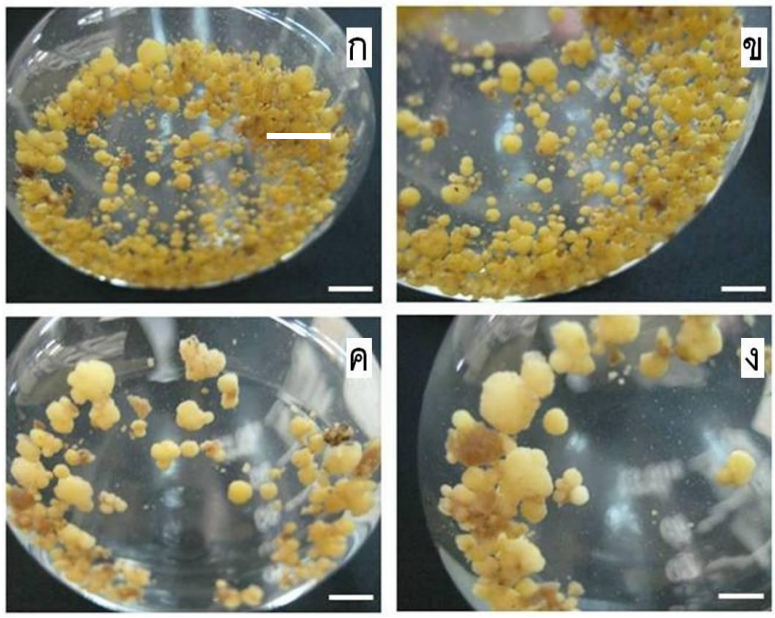
ตารางที่ 13 ผลของความเข้มข้นของซอร์บิทอลร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมลงในอาหารต่อขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน

ความเข้มข้นของซอร์บิทอล (โมลาร์)	อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอขนาดต่างๆ (มม.)				จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อฟลาสก์
	<1	1-2.0	2.1-3.0	>3.0	
ชุดควบคุม (3% ซูโครส)	0d	0f	100a	0d	2.17e
ซอร์บิทอล					
0.1	76.90a	16.80e	6.29f	0d	312.25c
0.2	14.24c	75.70a	14.28d	2.01bc	431.75b
0.3	0d	53.51b	50.21b	2.52b	154.42d
0.4	0d	53.52b	50.32b	2.40b	127d
ซอร์บิทอล +3% ซูโครส					
0.1	49.43b	40.74cd	9.26e	0.55cd	712.75a
0.2	38.91b	49.48bc	9.29e	2.30b	657.17a
0.3	1.15d	41.40cd	47.07c	10.36a	401.33b
0.4	0.89d	38.45d	49.51b	11.14a	301.83c
F-test	**	**	**	**	**
C.V. (%)	43.79	11.75	6.63	34.06	19.11

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ภาพที่ 20 ลักษณะและขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 เดือน (บาร์เท่ากับ 2 มิลลิเมตร)



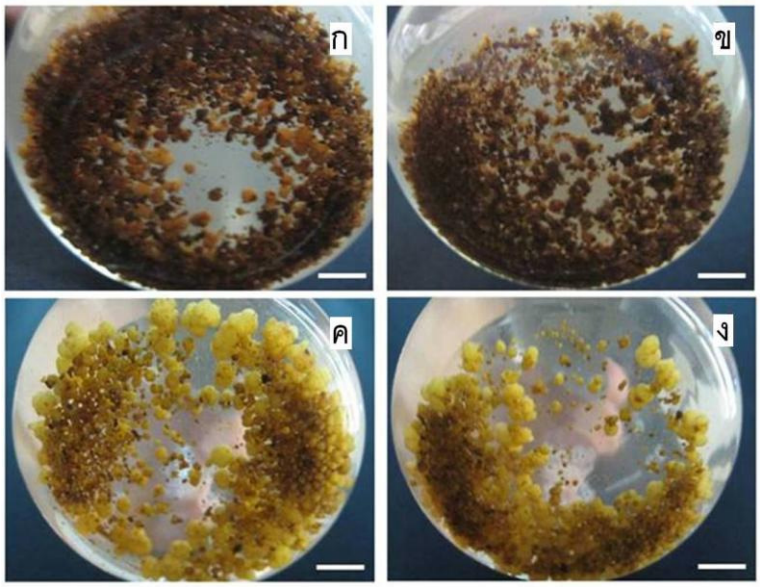
ภาพที่ 21 ลักษณะและขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน

ก: ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

ข: ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 0.5เซนติเมตร)

ค: ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

ง: ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 0.5 เซนติเมตร)



ภาพที่ 22 ลักษณะและขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน
ก: ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (บาร์เท่ากับ 0.8 เซนติเมตร)
ข: ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)
ค: ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.3 โมลาร์ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)
ง: ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

4. การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

4.1 ความสามารถในการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1

หลังจากที่วางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอทุกขนาดบนอาหารแข็งสูตรพื้นฐาน MS และสูตร 1/2MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 23ก และ ข) ในเดือนที่ 2 ของการวางเลี้ยง พบว่าโซมาติกเอ็มบริโอเหล่านี้แห้งและตายในที่สุด ในกรณีของการวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 1-2 มิลลิเมตร พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอทั้งหมดไม่มีการตอบสนองและมีสีซีดลงหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (ภาพที่ 23ค) ส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะสร้างจาวและเปลี่ยนเป็นสีเขียวหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน (ภาพที่ 24ก) การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการ

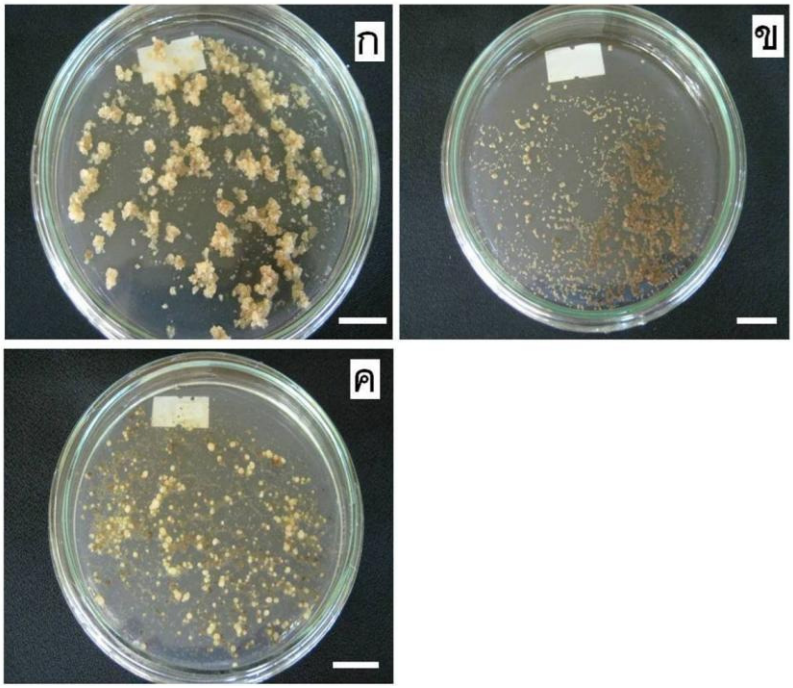
เจริญเติบโต ให้อัตราการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 และอัตราการเกิดของ โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (SSE) สูงกว่าอาหารสูตร 1/2MS จากทุกแหล่งที่มาของโซมาติกเอ็มบริโอ (ตารางที่ 14) เมื่อเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารสูตรที่ลดความเข้มข้นของไดแคมบาและการเติมผงถ่านให้อัตราการงอกสูงสุดเท่ากับ 15.83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 24ง) ส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอล ให้อัตราการเกิดของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 สูงสุดที่ 30.83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 25ข) นอกจากนี้ เมื่อตรวจสอบความสามารถในการงอก พบว่า SSE ที่เกิดจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำจากอาหารสูตรลดความเข้มข้นของไดแคมบาหรือการเติมผงถ่านเกิดอาการซีดและตายในที่สุด คงมีเฉพาะโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 เท่านั้นที่สามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้หลังจากวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 เดือน (ภาพที่ 24ฉ) อย่างไรก็ตาม SSE ที่เกิดจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำจากอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอลสามารถงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้หลังจากวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 เดือน (ภาพที่ 25ค)

ตารางที่ 14 ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อความสามารถในการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

วิธีชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ	สูตรอาหาร	อัตราการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเกิดของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (เปอร์เซ็นต์)
ไดแคมบา	1/2 MS	7.5abc	10b
	MS	13.33ab	25.83ab
ไดแคมบา +ผงถ่าน	1/2 MS	10abc	12.5b
	MS	15.83a	21.67ab
ซอร์บิทอล	1/2 MS	3.33c	14.16b
	MS	4.16bc	30.83a
F-test		*	*
C.V. (%)		69.19	49.96

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

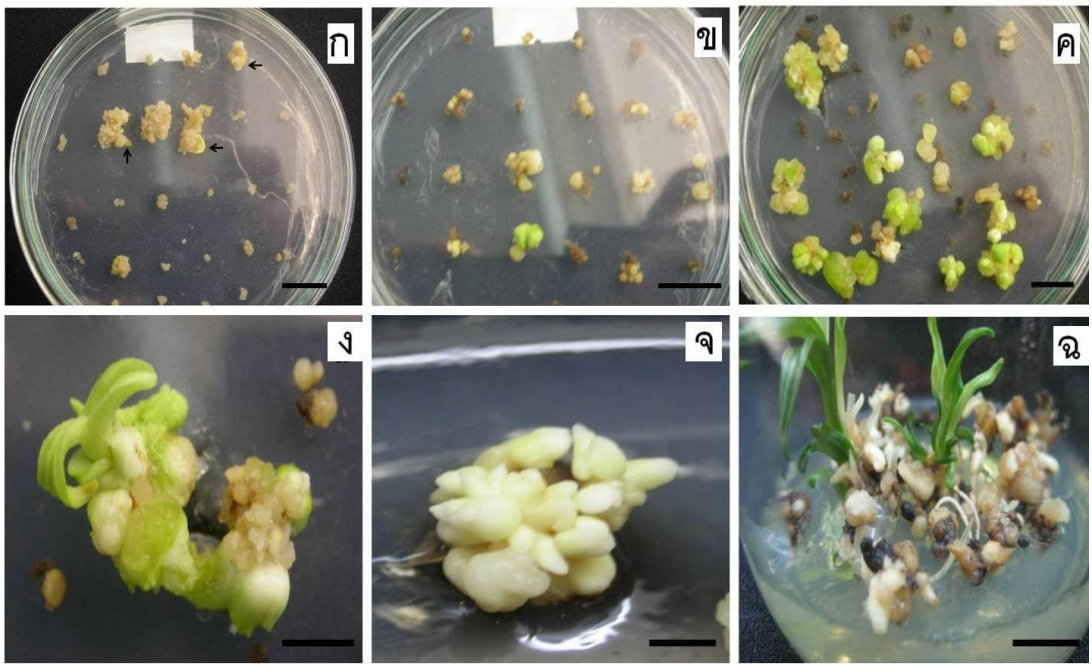


ภาพที่ 23 การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

ก: โซมาติกเอ็มบริโอขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร ที่ชักนำได้จากอาหารสูตรลดความเข้มข้นของไดแคมบา วางเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 1 เดือน

ข: โซมาติกเอ็มบริโอขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร ที่ชักนำได้จากอาหารสูตรเติมซอร์บิทอล วางเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 1 เดือน

ค: โซมาติกเอ็มบริโอขนาดเล็กกว่า 1-2 มิลลิเมตร ที่ชักนำได้จากอาหารสูตรเติมซอร์บิทอล วางเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 2 เดือน



ภาพที่ 24 การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของไดแคมบาหรือเติมผงถ่าน หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

ก: โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารเหลวสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตวางเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์เท่ากับ 1.0 เซนติเมตร

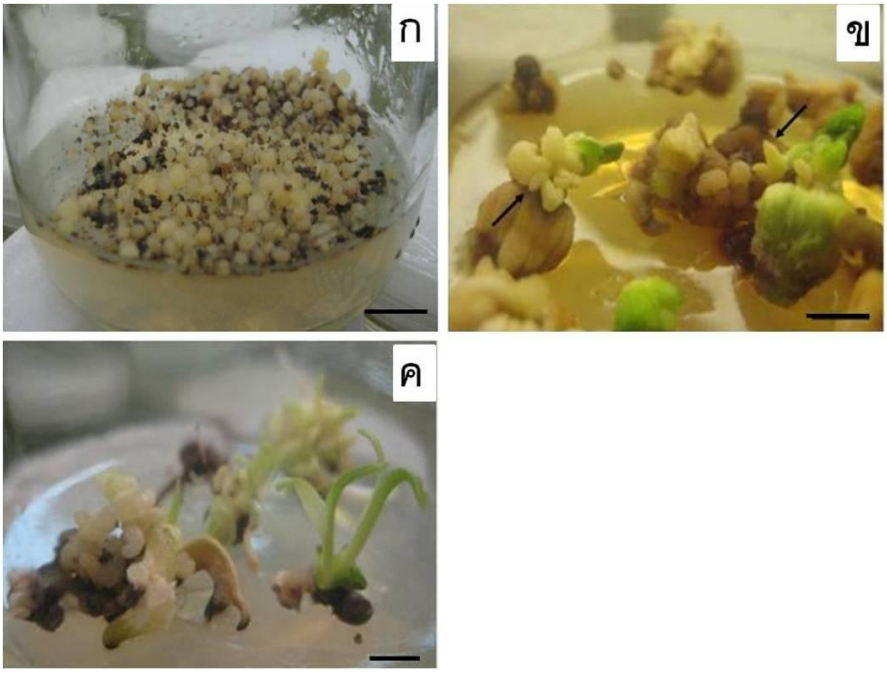
ข: โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารเหลวสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์เท่ากับ 1.0 เซนติเมตร)

ค: haustorium โซมาติกเอ็มบริโอวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน (บาร์เท่ากับ 1.0 เซนติเมตร)

ง: การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน (บาร์เท่ากับ 1.0 เซนติเมตร)

จ: SSE ที่เกิดจากการวางเลี้ยง haustorium โซมาติกเอ็มบริโอวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน (บาร์เท่ากับ 0.5 เซนติเมตร)

ฉ: ต้นกล้าที่ได้จากการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 9 เดือน (บาร์เท่ากับ 1.0 เซนติเมตร)



ภาพที่ 25 การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมซอร์บิทอลหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

ก: โซมาติกเอ็มบริโอขนาดเล็กกว่า 2 มิลลิเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์เท่ากับ 1.0 เซนติเมตร)

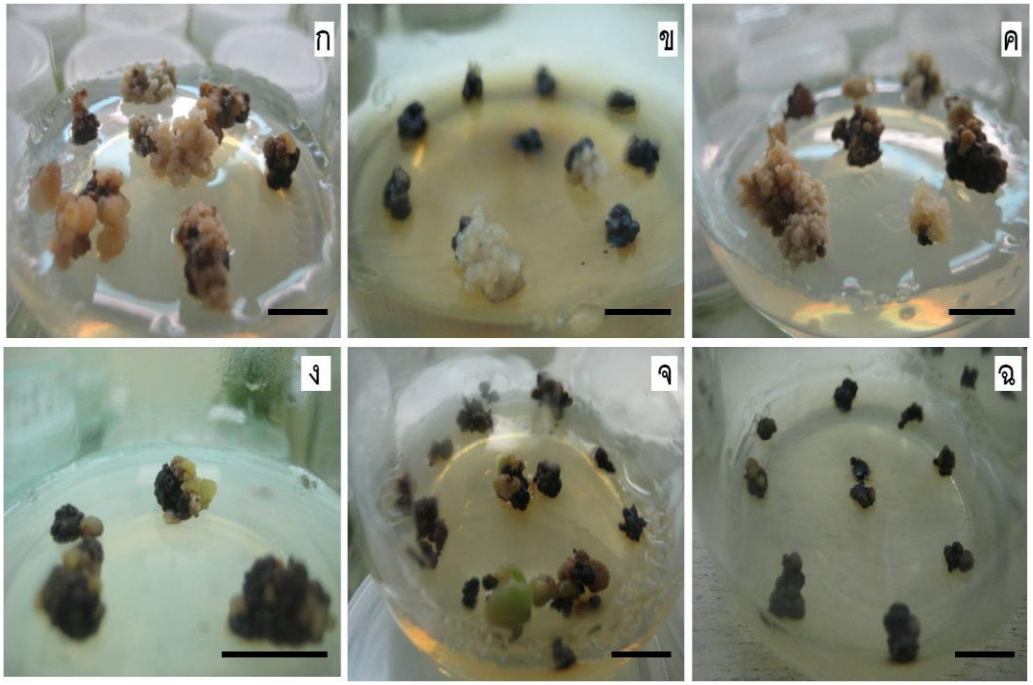
ข: SSE ที่เกิดจากการวางเลี้ยง haustorium โซมาติกเอ็มบริโอวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน (บาร์เท่ากับ 0.5 เซนติเมตร)

ค: ต้นกล้าที่ได้จากการชักนำการงอกของ SSE หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 9 เดือน (บาร์เท่ากับ 1.0 เซนติเมตร)

4.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารแข็งหรืออาหารเหลวแบบชั่วคราวต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1

การทรีตโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็งที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลาสั้นๆ 1-4 สัปดาห์ พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ทรีตมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองของโซมาติกเอ็มบริโอ โดยการทรีตสารเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเฉลี่ย 30 เปอร์เซ็นต์ (ไม่แสดงข้อมูล) และลดลงเมื่อระยะเวลานานขึ้น โดยการทรีตสารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยเหลือเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ (ไม่แสดงข้อมูล) การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินทุกชนิดหรือพาโคลบิวทาโซลในทุกความเข้มข้น ส่งผลให้โซมาติกเอ็มบริโอหยุดการพัฒนาแต่มีการสร้างแคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันอย่างหลวมๆ เกิดขึ้น (ภาพที่ 26ก-ค) ส่วนการใช้ ABA และ GA_3 ในทุกความเข้มข้นส่งผลให้โซมาติกเอ็มบริโอเข้าสู่ระยะสร้างจาว เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวดังกล่าวมีสีเขียวเข้มแต่หยุดการพัฒนา (ภาพที่ 26ง-จ) ไม่มีการงอกหรือการสร้าง SSE เกิดขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้นก็เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

การทรีตโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลาสั้นๆ 1-4 สัปดาห์ ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอตายทั้งหมด (ภาพที่ 26ฉ) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (ไม่แสดงข้อมูล)



ภาพที่ 26 การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ บนอาหารแข็งหรือในอาหารเหลวแบบชั่วคราว หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (บาร์เท่ากับ 1.0 เซนติเมตร)

ก: โซมาติกเอ็มบริโอทรีตบนอาหารแข็งเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

ข: โซมาติกเอ็มบริโอทรีตบนอาหารแข็งเติม KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

ค: โซมาติกเอ็มบริโอทรีตบนอาหารแข็งเติม TDZ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

ง: โซมาติกเอ็มบริโอทรีตบนอาหารแข็งเติม ABA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

จ: โซมาติกเอ็มบริโอทรีตบนอาหารแข็งเติม GA_3 เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

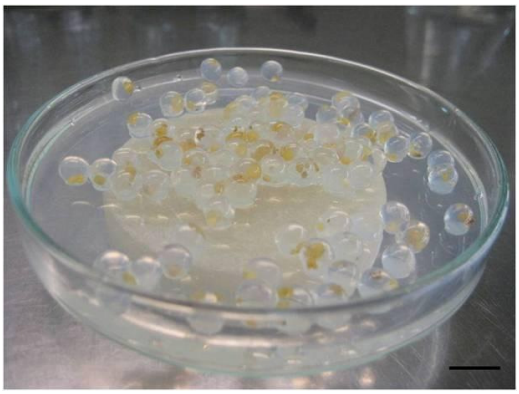
ฉ: โซมาติกเอ็มบริโอทรีตในอาหารเหลวเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

5. การศึกษาการผลิตเมล็ดเทียม

5.1 การผลิตเมล็ดเทียมโดยโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1

5.1.1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนต สารละลายอิเล็กโตรไลท์ และระยะเวลาที่จุ่มแช่ต่อการผลิตเมล็ดเทียม

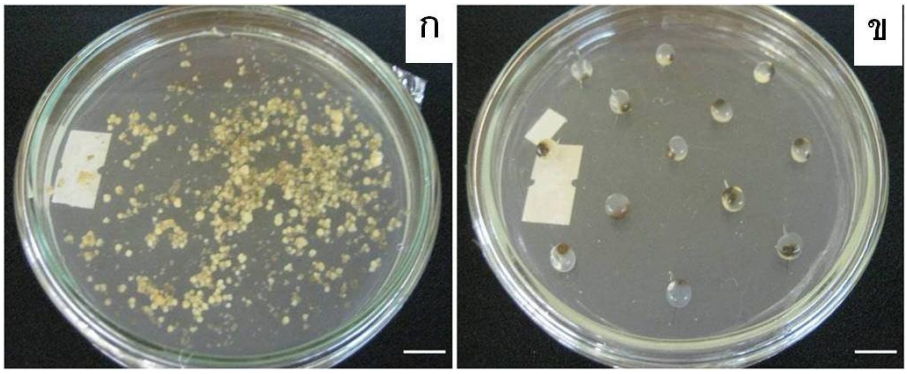
ความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนต สารละลายอิเล็กโตรไลท์และระยะเวลาที่จุ่มแช่ในสารละลายอิเล็กโทรไลท์มีระดับความเหมาะสมที่แตกต่างกันในแต่ละพืช ในการศึกษานี้ โซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมไนเตรทความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้ผลิตเมล็ดเทียมของปาล์มน้ำมัน ความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนตที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เมล็ดเทียมที่ผลิตได้มีความอ่อนนุ่มเกินไปจนทำให้ยากต่อการปฏิบัติและการเพาะเลี้ยง ในขณะที่โซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เมล็ดเทียมมีความแข็งมากเกินไปจนอาจจะทำให้โซมาติกเอ็มบริโอไม่สามารถงอกออกมาได้ ชนิด ความเข้มข้นและระยะเวลาในการจุ่มแช่สารอิเล็กโตรไลท์ มีผลต่อการผลิตเมล็ดเทียมเช่นเดียวกัน ทั้งแคลเซียมคลอไรด์และแคลเซียมไนเตรทที่ความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ ให้เมล็ดเทียมที่มีลักษณะเหมือนกัน การจุ่มแช่เมล็ดเทียมเป็นเวลา 15 นาที มีความเหมาะสมมากกว่าในการผลิตเมล็ดเทียมถึงแม้ว่าเมล็ดเทียมที่ผลิตได้จะมีลักษณะเหมือนกัน (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 การห่อหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันด้วยอาหารสูตร MS เติมโซเดียมแอลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แช่ในสารละลายแคลเซียมไนเตรทเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

5.1.2 ผลของขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอต่อการผลิตเมล็ดเทียม

โซมาติกเอ็มบริโอทุกขนาดที่มีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตและจุ่มแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตอบสนองในทางลบ ทำให้โซมาติกเอ็มบริโอทั้งหมดตาย การห่อหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอขนาดเล็ก (1-2 มิลลิเมตร) ส่งผลให้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายภายใน 1 สัปดาห์ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอก (อาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต) นอกจากนี้ยังพบว่าการห่อหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 3 มิลลิเมตร ด้วยวิธีการนี้ ส่งผลให้โซมาติกเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายภายใน 1 เดือน หลังจากวางเลี้ยง (ภาพที่ 28ข) โซมาติกเอ็มบริโอทุกขนาดที่มีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตและจุ่มแช่ในสารละลายแคลเซียมไนเตรทรอดชีวิตทั้งหมด หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลา 1 เดือน โซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2 และ 3 มิลลิเมตร มีการเจริญเติบโตโดยมีการเพิ่มขนาดขึ้น 1-2 เท่า หลังจาก วางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และเปลี่ยนเป็นสีเขียวหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน อย่างไรก็ตาม โซมาติกเอ็มบริโอทั้งหมดไม่มีการพัฒนาหรืองอกซึ่งเหมือนกับโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่ได้ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต (ภาพที่ 28ก)



ภาพที่ 28 การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

ก: โซมาติกเอ็มบริโอวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน

ข: โซมาติกเอ็มบริโอขนาด 3 มิลลิเมตร ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ และแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น

100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน

5.2 การผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2

การผลิตเมล็ดเทียมจาก SSE ทำโดยใช้โซเดียมแอลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ แช่ในสารละลายแคลเซียมไนเตรทเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที เมล็ดเทียมที่ผลิตได้มีการตอบสนองในทางบวกแม้ว่ามีบางส่วนที่ตายไป การตอบสนองที่ดีที่สุดพบใน SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงซึ่งสามารถงอกได้หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกได้ภายใน 1 สัปดาห์ และมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 95.24 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ SSE ที่ได้รับการห่อหุ้มด้วยกัน อย่างไรก็ตาม SSE ที่ไม่ได้รับการห่อหุ้มทุกระยะมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากชักนำการงอกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ตารางที่ 15) อัตราการงอกของ SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ได้รับการห่อหุ้มเท่ากับ 77.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งงอกเป็นยอด 73.01 เปอร์เซ็นต์ และเป็นราก 4.76 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลา 1 เดือน (ตารางที่ 16) หลังจากชักนำการงอกเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ได้รับการห่อหุ้มสามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบรูณ์ได้ 9.43 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 29) ขณะที่ SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ไม่มีการห่อหุ้มสามารถงอกเป็นต้นกล้าปกติได้ 57 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ SSE ระยะสร้างจาวที่ได้รับการห่อหุ้มงอกเป็นต้นกล้าปกติ 6.49 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่ได้ห่อหุ้มงอกเป็นต้นกล้าปกติ 27.27 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 15 อัตราการรอดชีวิตของ SSE ระยะต่างๆ ที่ผ่านและไม่ผ่านการห่อหุ้มหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลาต่างๆ

ระยะของ SSE	อัตราการรอดชีวิตที่ระยะเวลาต่างๆ (%)			
	1 สัปดาห์	1 เดือน	3 เดือน	5 เดือน
ระยะรูปกลม				
ไม่ห่อหุ้ม	100a	100a	0e	0e
ห่อหุ้ม	0e	0e	0e	0e
ทอร์ปิโด				
ไม่ห่อหุ้ม	100a	100a	100a	100a
ห่อหุ้ม	31d	17.6d	5.8d	5.8d
สร้างจาว				
ไม่ห่อหุ้ม	100a	100a	100a	100a
ห่อหุ้ม	88c	42.7c	38.8c	38.9c
สร้างใบเลี้ยง				
ไม่ห่อหุ้ม	100a	100a	100a	100a
ห่อหุ้ม	95.2b	84.2b	79.9b	79.9b
กลุ่มก้อนของระยะรูปกลม				
ไม่ห่อหุ้ม	100a	100a	100a	100a
ห่อหุ้ม	100a	100a	100a	100a
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	3.4	5.3	5.1	5.1

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

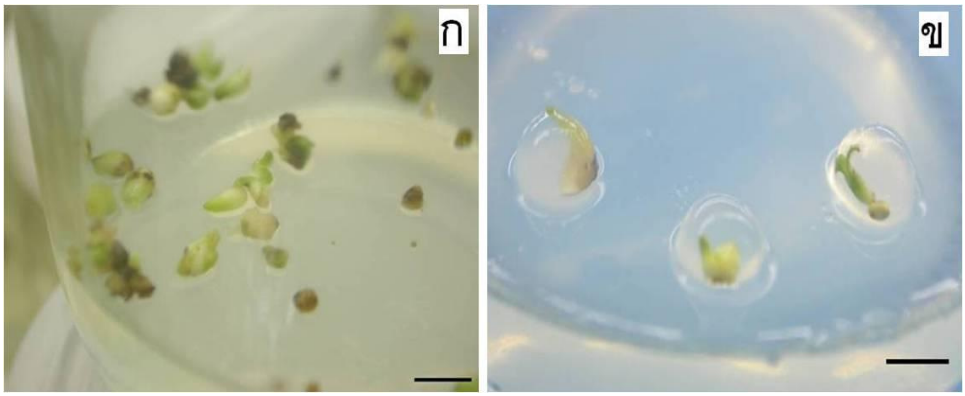
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 16 ลักษณะการงอกของ SSE ที่ได้รับและไม่ได้รับการห่อหุ้มหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลาต่างๆ

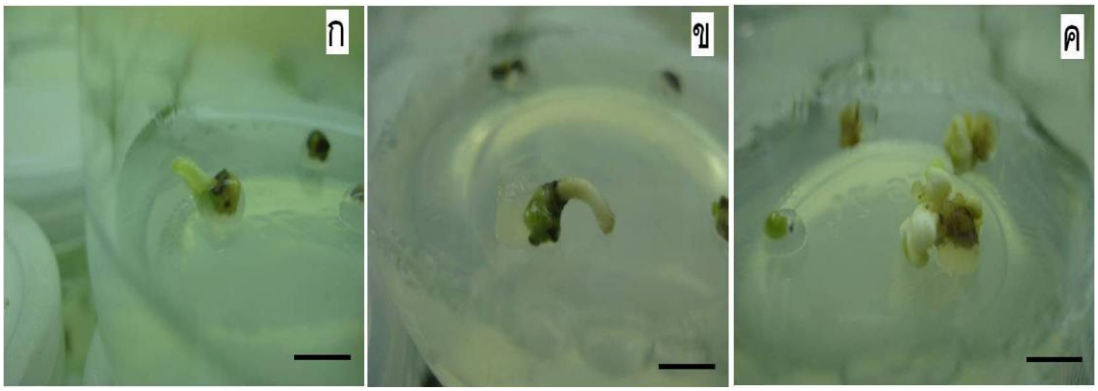
ระยะของ SSE	รูปแบบการวางเลี้ยง	อัตราการงอกของยอดที่ระยะเวลาต่างๆ				อัตราการงอกของรากที่ระยะเวลาต่างๆ				อัตราการงอกของต้นกล้าปกติที่ระยะเวลาต่างๆ			
		1 สัปดาห์	1 เดือน	3 เดือน	5 เดือน	1 สัปดาห์	1 เดือน	3 เดือน	5 เดือน	1 สัปดาห์	1 เดือน	3 เดือน	5 เดือน
รูปกลม	ไม่ห่อหุ้ม	0b	0d	0e	0f	0c	0d	0c	0d	0	0b	0d	0d
	ห่อหุ้ม	0b	0d	0e	0f	0c	0d	0c	0d	0	0b	0d	0d
ทอร์ปิโด	ไม่ห่อหุ้ม	0b	0d	0e	55.5c	0c	0d	0c	10.4c	0	0b	0d	10.4c
	ห่อหุ้ม	0b	5.8c	0e	0f	0c	5.8c	0c	0d	0	0b	0d	0d
สร้างจาว	ไม่ห่อหุ้ม	0b	0d	55.8c	55.8c	0c	0d	13.5b	27.2b	0	0b	13.5b	27.2b
	ห่อหุ้ม	1.8b	6.4c	6.4d	6.4e	29.4a	27.2a	31.2a	27.2b	0	0b	0d	6.4c
สร้างใบเลี้ยง	ไม่ห่อหุ้ม	0b	57.2b	68.4b	68.4b	0c	0d	36.6a	57.2a	0	0b	36.6a	57.2a
	ห่อหุ้ม	73.0a	55.8b	51.5c	46.5d	4.7b	13.8b	19.5b	23.3b	0	4.4a	5.6c	9.4c
กลุ่มก้อนของระยะรูปกลม	ไม่ห่อหุ้ม	0b	0d	0e	57.2c	0c	0d	0c	0d	0	0b	0d	0d
	ห่อหุ้ม	0b	68.1a	95.4a	95.4a	0c	4.5c	4.5c	4.5cd	0	0b	0d	0d
F-test		**	**	**	**	**	**	**	**		**	**	**
C.V. (%)		19.7	11.2	15.3	11.6	63.3	62.9	45.3	33.2		40.8	44.9	33.0

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

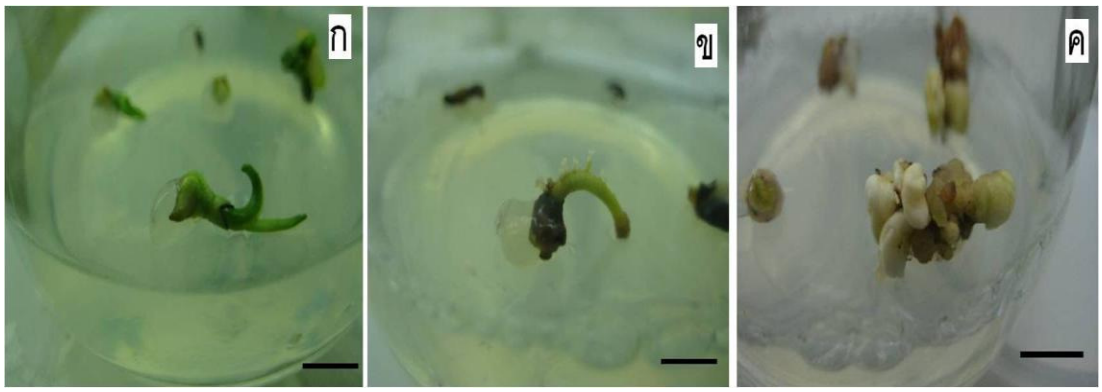
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 29 การผลิตเมล็ดเทียมจาก SSE ด้วยโซเดียมแอลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ แช่ในสารละลายแคลเซียมไนเตรทเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที และวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นระยะเวลาต่างๆ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)
ก: SSE เดี่ยวๆ ระยะต่างๆ วางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลา 1 เดือน
ข: SSE ที่ได้รับการห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต



ภาพที่ 30 การงอกของเมล็ดเทียมหลังจากวางเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)
ก: การงอกของยอดจาก SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ได้รับการห่อหุ้ม
ข: การงอกของรากจาก SSE ระยะสร้างจาวที่ได้รับการห่อหุ้ม
ค: การแตกและเพิ่มขนาดของกลุ่มก้อนของ SSE ระยะรูปกลมที่ได้รับการห่อหุ้ม

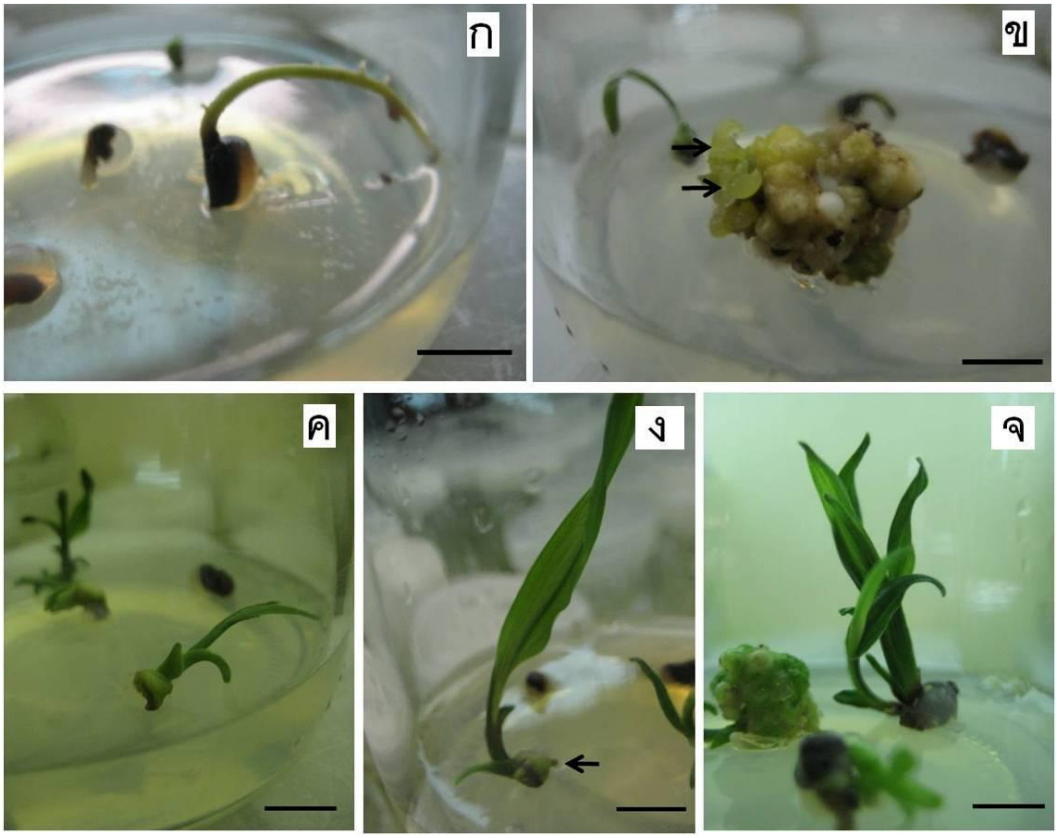


ภาพที่ 31 การงอกของเมล็ดเทียมหลังจากวางเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นระยะเวลา 1 เดือน (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

ก: การยืดยาวของยอดจาก SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ได้รับการห่อหุ้ม (แสดงใบที่ 1 และ 2)

ข: การยืดยาวของรากจาก SSE ระยะสร้างจาวที่ได้รับการห่อหุ้ม

ค: การแตกและเพิ่มขนาดของกลุ่มก้อนของ SSE ระยะรูปกลมที่ได้รับการห่อหุ้ม



ภาพที่ 32 การงอกของเมล็ดเทียมหลังจากวางเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นระยะเวลาต่างๆ (บาร์เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

ก: การแตกและเพิ่มขนาดของกลุ่มก้อนของ SSE ระยะรูปกลมที่ได้รับการห่อหุ้ม (ลูกศรแสดงการเกิดยอด) หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

ข: การยืดยาวของยอดจาก SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ได้รับการห่อหุ้ม (แสดงใบที่ 1 และ 2) หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลา 3 เดือน

ค: การยืดยาวของยอดจาก SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ได้รับการห่อหุ้ม (แสดงใบที่ 1 2 และ 3) หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลา 3 เดือน

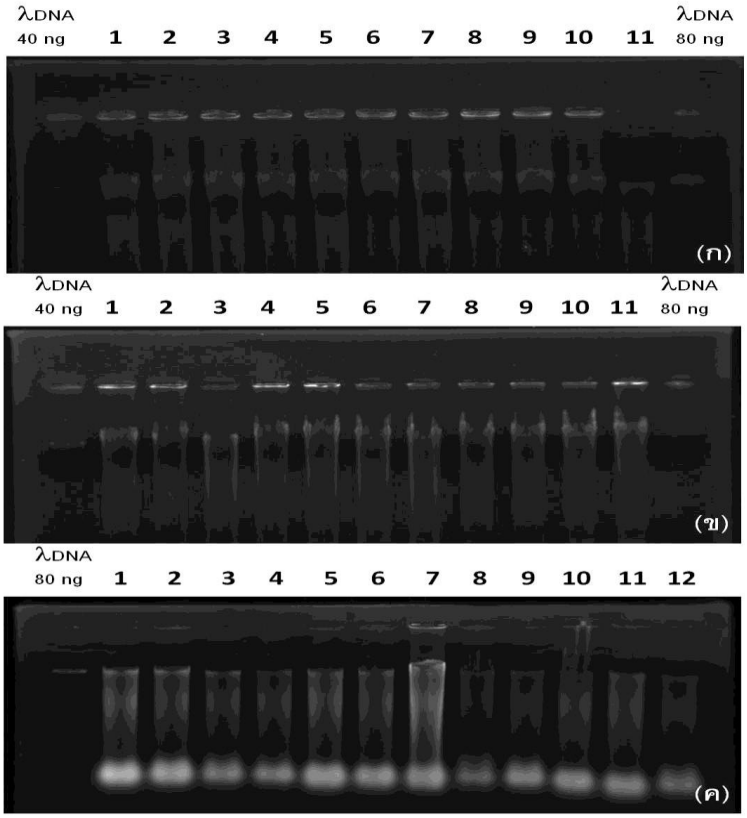
ง: ต้นกล้าปกติหลังจากวางเลี้ยง SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ได้รับการห่อหุ้ม (ลูกศรแสดงการงอกของราก) เป็นเวลา 3 เดือน

จ: ต้นกล้าที่สมบูรณ์หลังจากวางเลี้ยง SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ได้รับการห่อหุ้มเป็นเวลา 5 เดือน

6. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

6.1 การสกัดและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้นในการศึกษาการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นและการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ซัสเพนชั่นตามวิธีของ Te-chato (2000) พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ครั้งละประมาณ 80 - 160 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 30ก และ ข) สำหรับการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ครั้งละประมาณ 80 - 160 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 30ค) ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 3 ตัวอย่างนี้ สามารถนำไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาPCRได้



ภาพที่ 33 ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันแหล่งต่างๆ

ก: ดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัส

ข: ดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ซัสเพนชั่น

ค: ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อนของต้นกล้า

6.2 การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD

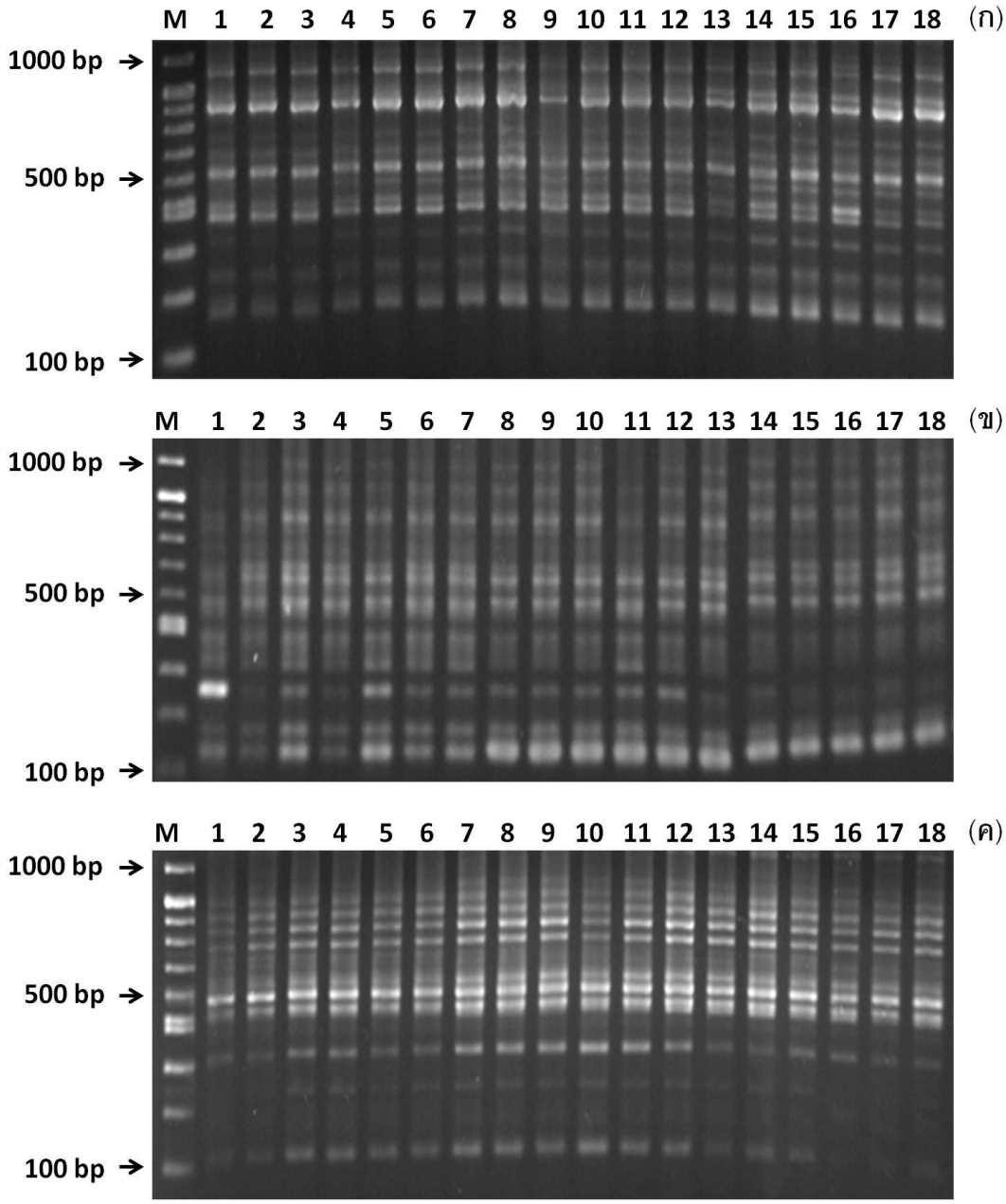
จากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 10 ไพรเมอร์ คือ OPA-03 OPA-19 OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPB-08 OPJ-04 OPN-15 OPR-11 และ OPT-06 พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPB-08 OPN-15 และ OPT-06 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างและให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน (ตารางที่ 17 และภาพที่ 31) สามารถนำไปใช้ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและเซลล์ซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้ โดยแถบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิด มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (monomorphism) อย่างไรก็ตาม ไพรเมอร์ OPA-03 OPA-19 OPJ-04 และ OPR-11 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากทุกตัวอย่างได้ จึงไม่นำมาใช้เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม (ภาพที่ 32) การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นโดยใช้เทคนิค RAPD ไม่พบความแปรปรวนของเนื้อเยื่อในระหว่างขั้นตอนการเพาะเลี้ยงในการศึกษานี้

ตารางที่ 17 ความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวด้วยเทคนิค RAPD

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5'→ 3'	ความชัดเจน
OPA-03	AGTCAGCCAC	+++
OPA-19	GTCCACACGG	+++
OPAB-01	GGGCGACTAC	++++
OPAB-09	CCGTCGGTAG	++++
OPAB-14	CAAGGGCAGA	++++
OPB-08	GTCCGTATGG	++++
OPJ-04	CCGAACACGG	+++
OPN-15	CAGCGACTGT	++++
OPR-11	AAGTGCGACC	+++
OPT-06	GTAGCCGTCT	++++

++++ เพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง ให้แถบชัดเจน

+++ เพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง ให้แถบไม่ชัดเจน



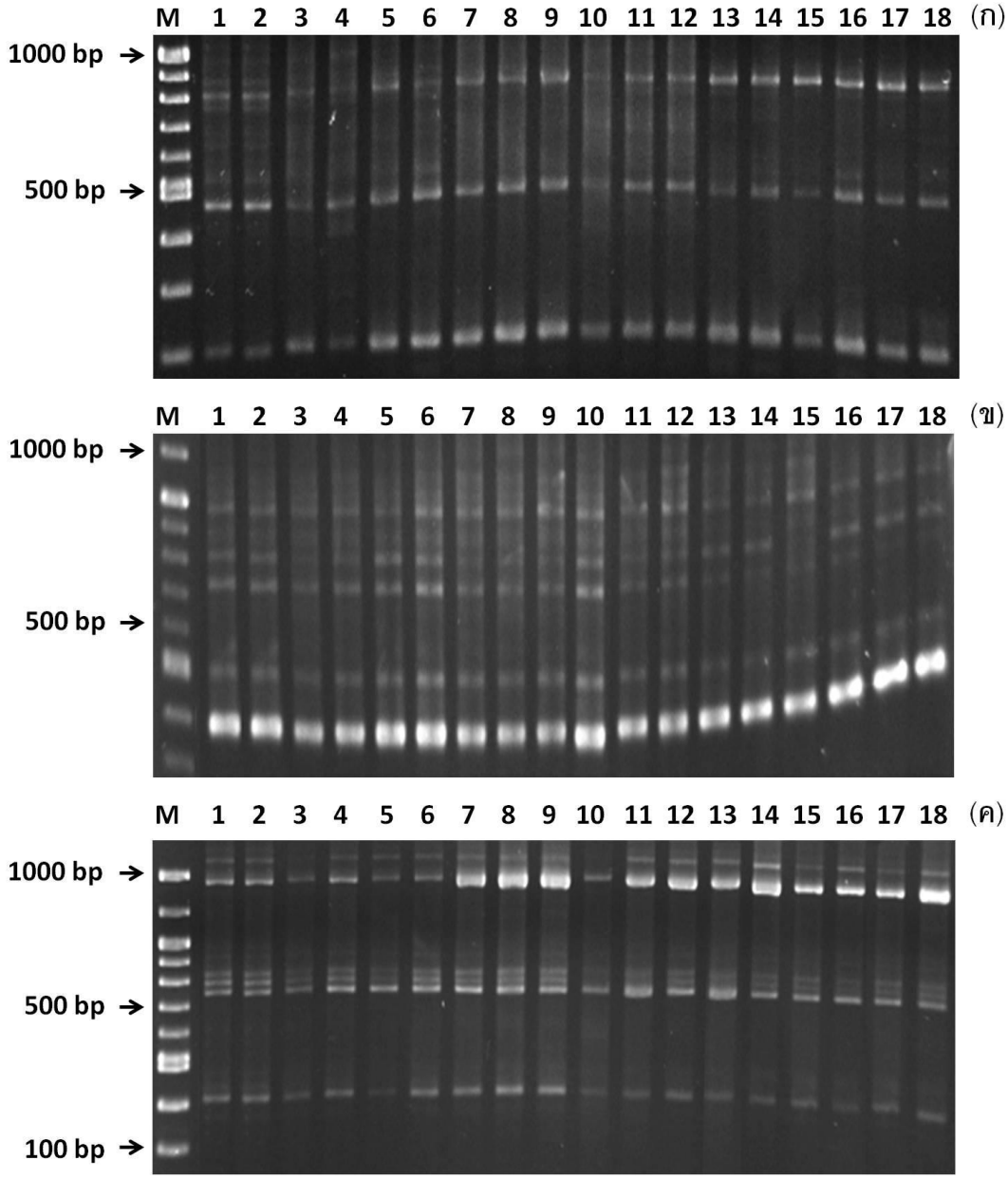
ภาพที่ 34 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ขัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAB-01 (ก) OPAB-09 (ข) และ OPAB-14 (ค)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์ซัสเพนชั่น

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน



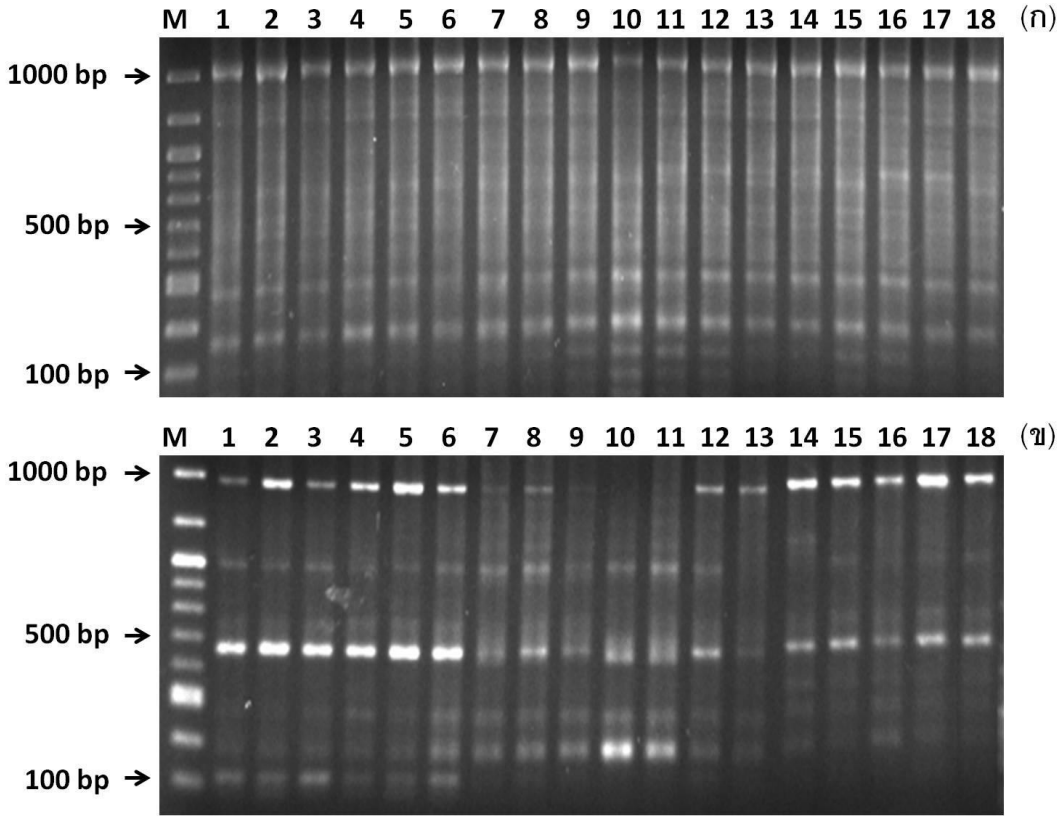
ภาพที่ 35 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ขัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-08 (ก) OPN-15 (ข) และ OPT-06 (ค)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์ซัสเพนชั่น

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน



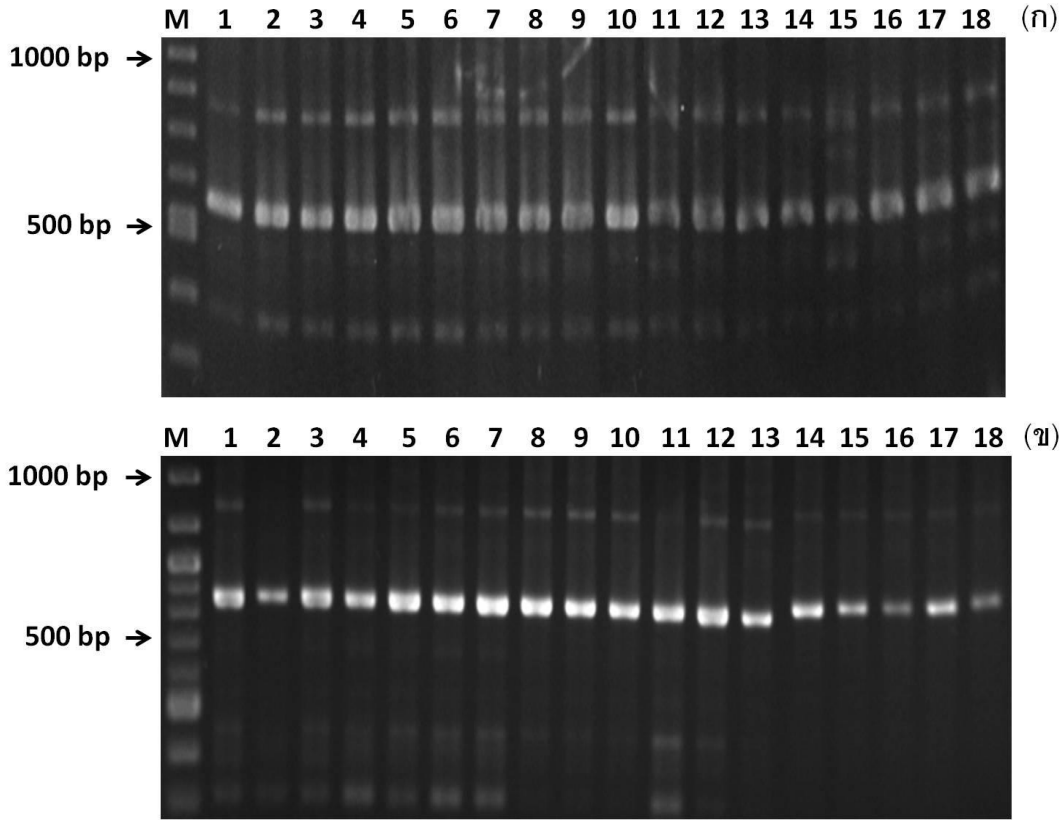
ภาพที่ 36 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPA-03 (ก) และ OPA-19 (ข)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์ซัสเพนชั่น

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 37 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPJ-04 (ก) และ OPR-11 (ข)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

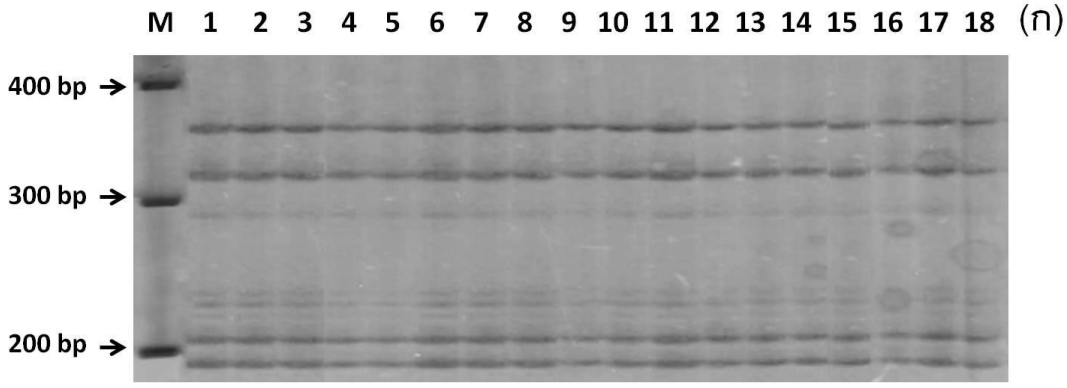
lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์ซัสเพนชั่น

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

6.3 การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิค SSR

จากการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนตัวอย่างต่างๆ ของปาล์มน้ำมันที่ผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคPCRแล้วนำมาตรวจสอบบนอะคริละไมด์เจลอิเลคโทรโฟลิซิสแนวดิ่ง พบว่า ทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง และให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน นอกจากนี้ แถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็น monomorphism (ภาพที่ 33) สามารถนำมาใช้ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อระยะต่างๆ ของปาล์มน้ำมันระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ จากการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง



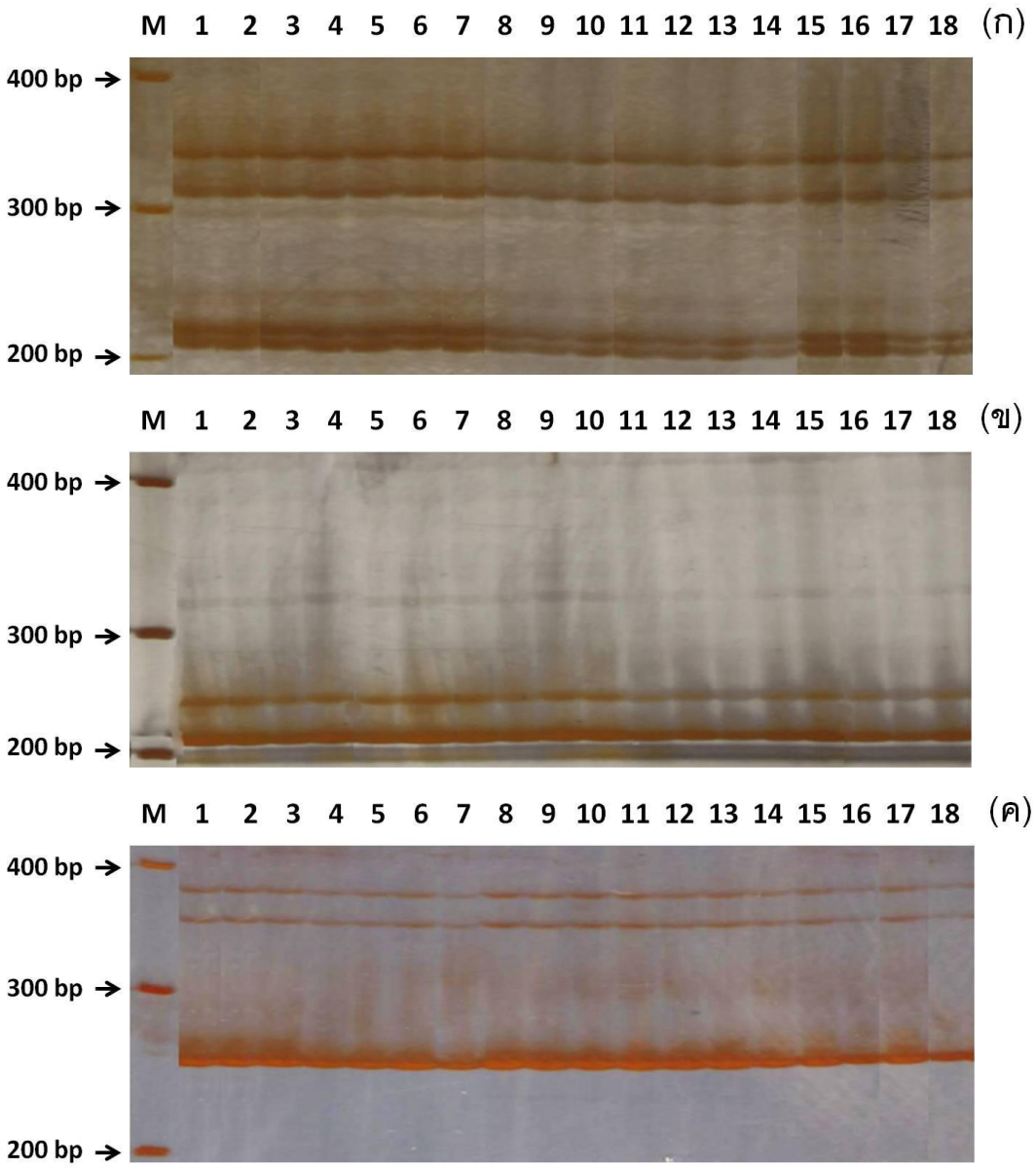
ภาพที่ 38 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค SSR เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์ซัสเพนชั่น

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน



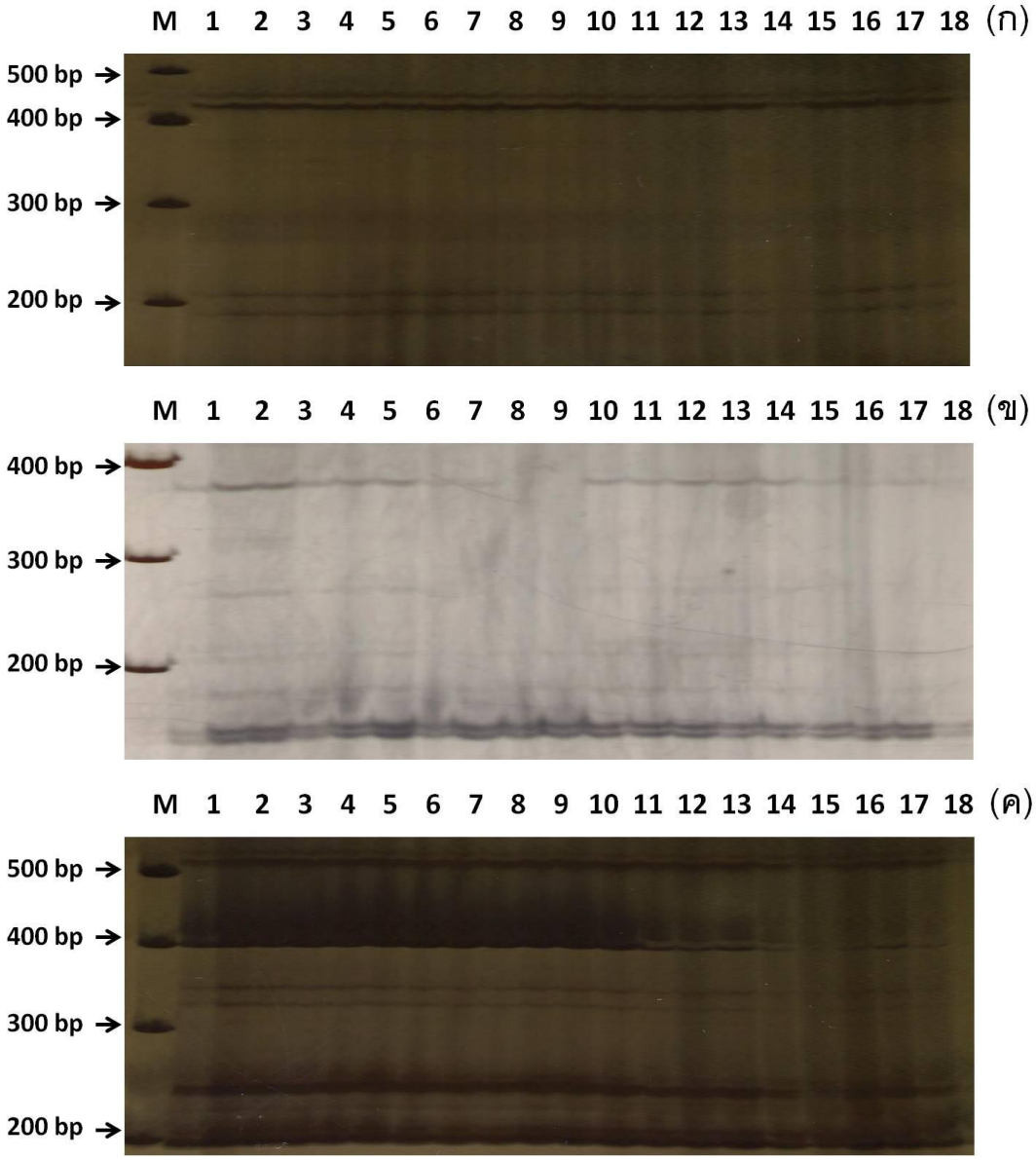
ภาพที่ 39 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค SSR เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243 (ก) EgCIR0337 (ข) และ EgCIR0409 (ค)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์ซัสเพนชั่น

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน



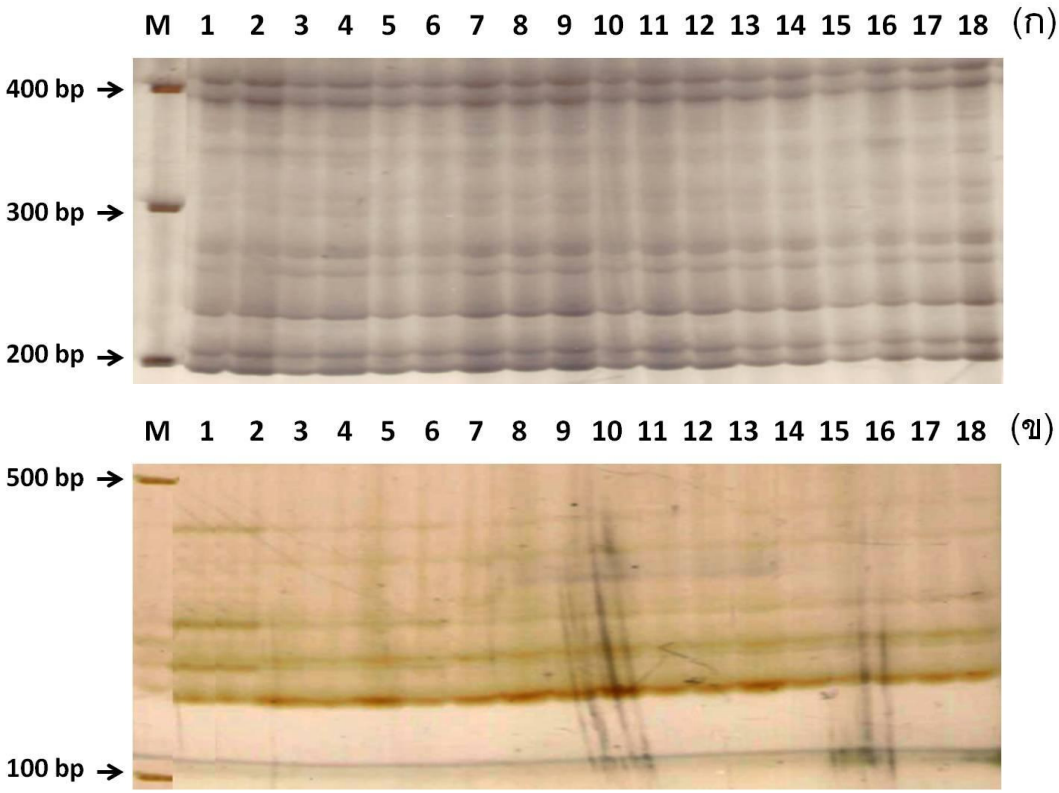
ภาพที่ 40 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ขัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค SSR เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446 (ก) EgCIR0465 (ข) และEgCIR0781 (ค)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์ซัสเพนชั่น

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 41 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ขัดเจนของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากเทคนิค SSR เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905 (ก) และ EgCIR1772 (ข)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์ซัสเพนชั่น

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การชักนำและการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

แคลลัสเริ่มต้นที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนใบอ่อนของต้นกล้าและปาล์มน้ำมันต้นโตไม่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้นในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่มีคุณสมบัติในด้านการแบ่งเซลล์ที่รวดเร็วเพียงอย่างเดียวไม่สามารถพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีหน้าที่เฉพาะได้ อีกทั้ง ยังไวต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตจึงส่งผลให้ได้เนื้อเยื่อที่ไม่พึงประสงค์จากผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ที่ใช้ โดยเฉพาะ NAA ส่งผลให้แคลลัสเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีลักษณะการพัฒนาคล้ายรากและไม่มีการแตกตัวให้เป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กๆ หรือเซลล์ซัสเพนชั่นได้ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Teixeira และคณะ (1995) ที่ใช้ primary globular callus (PGC) ของปาล์มน้ำมันเป็นวัสดุพืชเริ่มต้นในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น โดยย้ายเลี้ยงแคลลัสดังกล่าวในอาหารสูตร Y_3 เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดเซลล์ซัสเพนชั่นที่มีความละเอียดของกลุ่มเซลล์สูงได้แต่ไม่สามารถชักนำให้พัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ เนื่องจากเซลล์ในซัสเพนชั่นไม่มีคุณสมบัติในการเป็นเอ็มบริโอนิคเซลล์ ในทางตรงข้าม de Touchet และคณะ (1991) ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นวัสดุพืชเริ่มต้นในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น ทำให้ได้เซลล์ในซัสเพนชั่นที่มีความละเอียดสูงเหมือนกับเซลล์ที่ชักนำได้จาก PGC แต่มีลักษณะเป็นกลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญที่มีความเป็นเอ็มบริโอเจนิคสูงและพร้อมที่จะพัฒนามากกว่า อย่างไรก็ตาม อัตราการประสบความสำเร็จในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการศึกษาข้างต้นนั้นใช้ปาล์มน้ำมันที่มีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ดังนั้นผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ยังขึ้นอยู่กับพันธุกรรมหรือโคลนที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงอีกด้วย

การย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันต้นโตลงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นเริ่มต้นที่มีความละเอียดของตะกอนเซลล์สูงสุดและเมื่อย้ายเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นส่งผลให้ตะกอนเซลล์มีความละเอียดเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ ยังส่งผลให้อัตราการเพิ่มของปริมาตรตะกอนเซลล์จากตะกอน

เซลล์เริ่มต้นเพิ่มเป็น 2 เท่า (doubling time: t_d) เร็วกว่า 15 วัน ซึ่งปริมาตรตะกอนเซลล์ที่วัดได้ในวันที่ 15 หลังจากย้ายเลี้ยง มีปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 3.41 มิลลิลิตร จากปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นที่ 1.5 มิลลิลิตร หรือคิดเป็นอัตราการเพิ่มเท่ากับ 2.09 เท่า สอดคล้องกับการรายงานของ Teixeira และคณะ (1995) ที่ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันอย่างหลวมๆ (Friable Embryogenic Tissue: FET) มาใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้นในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น ส่งผลให้ปริมาตรตะกอนเซลล์มีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยอัตราการเพิ่มปริมาตรเป็น 2 เท่า อยู่ที่ 7 วัน หลังจากย้ายเลี้ยง ซึ่งมีความแตกต่างจากการศึกษาของนักวิจัยหลายๆ คน ที่ได้รายงานว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ บนอาหารแข็ง ส่งผลให้มีอัตราการเพิ่มปริมาณแคลลัสเป็น 2 เท่า มีความแตกต่างกันอยู่ในช่วง 30-40 วัน หลังจากย้ายเลี้ยง (de Touchet *et al*., 1991; Duval *et al*., 1993; Tahardi, 1999; Tarmizi *et al*., 2003; Soh *et al*., 2006)

2. การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ซัสเพนชั่น

การย้ายเลี้ยงปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นที่ 1 มิลลิลิตร ให้อัตราการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ 3.61 เท่า หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน สอดคล้องกับการศึกษาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันของ Gorret และคณะ (2004) ที่รายงานว่า ปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลโดยตรงต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ทั้งการเพาะเลี้ยงแบบที่มีการย้ายเลี้ยงอย่างสม่ำเสมอและให้อาหารอย่างต่อเนื่องแบบไบโอรีเอคเตอร์ โดยสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมคือ การใช้เซลล์เริ่มต้นปริมาณ 0.7 กรัม เพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับการศึกษาของ de Touchet และคณะ (1991) รายงานว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันอยู่ในช่วงระหว่าง 0.1-0.3 กรัมต่ออาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร Teixeira และคณะ (1995) ใช้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ 1.5 กรัม เพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วันสูงสุด ในการศึกษานี้ไม่ได้ใช้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้นเป็นหน่วยกรัมน้ำหนักสดแต่ใช้ในหน่วยมิลลิลิตรตะกอนเซลล์ อย่างไรก็ตาม อัตราการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์มีความใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 3.3-3.57 เท่า ดังนั้นความเหมาะสมของอัตราส่วนระหว่างปริมาตรเซลล์เริ่มต้นกับปริมาตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ 1:25 เนื่องจาก การใช้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ 0.5 มิลลิลิตร ส่งผลให้มีการสิ้นเปลืองอาหารและพื้นที่ในการวางเลี้ยง ส่วนการใช้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่

1.5 มิลลิลิตร ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วงสัปดาห์สุดท้ายของการวางเลี้ยงคือ ทำให้เซลล์มีสีคล้ำขึ้นอันเนื่องมาจากการเริ่มมีการแย่งชิงอาหารเกิดขึ้น

แม้ว่า การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นลงในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 3.8 มิลลิลิตร แต่เมื่อทำการศึกษาลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชั่นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 7 และ 9 เปอร์เซ็นต์ มีการสะสมของเม็ดแป้งภายในเซลล์แตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมซูโครสความเข้มข้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มีการสะสมของเม็ดแป้ง ผลที่ได้นี้เกิดจากซูโครสความเข้มข้นสูงมีผลต่อค่าออสโมติคัมในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ทำให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีการปรับตัวโดยการสะสมของสารภายในเพื่อปรับค่าออสโมติคัมให้ใกล้เคียงกับภายนอกและสามารถดูดซึมธาตุอาหารต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงมาใช้ได้ Gorret และคณะ (2004) เพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันและรายงานว่า โดยทั่วไปซูโครสถูกย่อยเป็น ฟรุกโตสและกลูโคสก่อนที่เซลล์จะดูดซึมไปใช้ จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า จากแหล่งของคาร์บอนในรูปของซูโครสที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำไปใช้ในการสร้างน้ำหนักแห้ง 20 เปอร์เซ็นต์ ถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึม 1 เปอร์เซ็นต์ และถูกเปลี่ยนเป็นสารอื่นๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เอทธิลีนรวมถึงสารอื่นๆ ที่สะสมภายในเซลล์ 79 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอัตราส่วนของการสร้างน้ำหนักแห้งต่อปริมาณคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในไบโอรีเอคเตอร์ของปาล์มน้ำมันอยู่ที่ 0.18 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมซูโครส ดังนั้น การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสภายในอาหารเพาะเลี้ยงนอกจากมีผลช่วยกระตุ้นการสะสมสารอาหารภายในเซลล์แล้วยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์อีกด้วย

การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น 15 วันต่อรอบการย้ายเลี้ยง ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 7.74 มิลลิลิตร ในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน เมื่อนำปริมาตรตะกอนเซลล์ที่วัดได้ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงมาเขียนเป็นกราฟ พบว่า ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์มีรูปแบบคล้ายเส้นตรง ซึ่งหมายถึงเซลล์มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะ log phase ตลอดเวลา จึงทำให้เซลล์มีการแบ่งเซลล์อยู่ตลอดคล้ายคลึงกับการเพาะเลี้ยงในไบโอรีเอคเตอร์ ทำให้เซลล์ไม่เข้าสู่ช่วง stationary phase แต่เมื่อพิจารณาลักษณะของตะกอนเซลล์ พบว่า การย้ายเลี้ยงที่ความถี่ 15 และ 21 วันต่อรอบการย้ายเลี้ยง ให้ตะกอนเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำและเมื่อทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์มีแวคิวโอลขนาดใหญ่

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า เซลล์มีอาการซีดและตายในที่สุด ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยย้ายเลี้ยงทุกๆ 30 วัน มีการเจริญเติบโตตามปกติ (มีรูปแบบเป็นตัว S) ทั้งนี้อาจเกิดจากการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วทำให้การเกิดการถ่ายโอนสารพันธุกรรมบางส่วนไม่ครบ หรือ เกิดจากการใช้พลังงานจำนวนมากในกระบวนการแบ่งเซลล์ ทำให้มีการนำสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรทและโปรตีนที่สะสมอยู่ภายในเซลล์มาใช้ จึงทำให้คุณสมบัติความเป็นเอ็มบริโอเจนิคของเซลล์ลดลง Rho และ André (1991) รายงานว่า การลดลงของน้ำหนักแห้งของการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเกิดจากการหายใจในระดับเซลล์ โดยใช้สารอาหารที่สะสมอยู่ในเซลล์เป็นสารตั้งต้นหรืออาจเกิดจากการใช้แหล่งของคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงจนหมด ทำให้เกิดกระบวนการ proteolysis เปลี่ยนโปรตีนที่สะสมอยู่ในเซลล์เป็นแหล่งของคาร์บอนและนำไปใช้เป็นพลังงานต่อไป ซึ่งสิ่งนี้อาจเป็นสาเหตุของการขาดโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสก็เป็นได้

การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดีนีนซัลเฟตเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 5.53 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ในขณะที่ กรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์น้อยกว่าชุดควบคุม ดังนั้นการเติมอินทรีย์ไนโตรเจนลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน มีประสิทธิภาพดีไม่มากพอสำหรับการเพิ่มปริมาณและการพัฒนาของเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Padgett และ Leonard (1996) ซึ่งรายงานว่า กรดอะมิโนสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์พืชได้ดีในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง เมื่อกรดอะมิโนในอาหารถูกนำไปใช้หมดแล้วเซลล์พืชจึงเริ่มมีการดูดซึมไนเตรท Gorret และคณะ (2004) รายงานว่า การเติมกลูตามีนลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันเพื่อเป็นแหล่งของไนโตรเจน ไม่สามารถตรวจพบกลูตามีนในอาหารหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน จึงสรุปได้ว่า เซลล์พืชมีการดูดซึมกลูตามีนไปใช้อย่างรวดเร็วในช่วง 5 วันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจึงใช้แอมโมเนียมและไนเตรทเป็นแหล่งของไนโตรเจนในช่วงหลัง ในการศึกษาของ Lee และ Kirby (1986) พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของ *Pseudotsuga menziesii* โดยใช้อาหารสูตรที่เติมกลูตามีนเป็นแหล่งของไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวส่งผลให้เซลล์ในซัสเพนชั่นมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด ในขณะที่ การศึกษาของ Verhagen และ Warm (1989) ใน *Picea abies* พบว่า สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตรที่เติมกลูตามีนแต่ปราศจากแอมโมเนียมไนเตรทได้ เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์ (กลูตามีนและแอสพารา

จีน) กับสารอนินทรีย์ (แอมโมเนียมไนเตรทและโปแตสเซียมไนเตรท) ที่เติมลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง พบว่า ในอาหารที่เติมอินทรีย์ไนโตรเจนส่งผลให้มีอัตราการเกิด embryogenic lines สูงกว่าในอาหารสูตรที่เติมอนินทรีย์ไนโตรเจนถึง 3 เท่า จากการศึกษาของ Hristoforoglu และคณะ (1995) พบว่า embryogenic lines ของ *Abies alba* สามารถเพิ่มปริมาณและพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ได้ดีกว่า เมื่อเติมกลูตามีนและเคซีนไฮโดรไลเสทลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงด้วย การศึกษาของ Khlifi และ Tremblay (1995) ใน *Picea mariana* พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะสุกแก่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกลูตามีน ในขณะที่การศึกษาของ Hilae และ Te-chato (2005) พบว่า แหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอนมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดและการงอกของ SSE ของปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุไนโตรเจน (แอมโมเนียมไนเตรทและโปแตสเซียมไนเตรท) เป็น 1/2 1/4 หรือ 1/8 ซึ่งทำให้ปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียมภายในอาหารลดลงจาก 20.625 มิลลิโมลาร์ เป็น 10.31 5.15 และ 2.57 มิลลิโมลาร์ ไนเตรทในอาหารลดลงจาก 39.435 มิลลิโมลาร์ เป็น 19.72 9.86 และ 4.93 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่งผลให้อัตราการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ต่ำกว่าในอาหารสูตรปกติ แตกต่างจากการศึกษาของ Gorret และคณะ (2004) ซึ่งพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันที่ลดแอมโมเนียมไนเตรทลงจาก 1.6 เป็น 1.45 กรัมต่อลิตร และไม่เติมกลูตามีนไม่มีผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไนโตรเจนส่วนเกินที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์ จากการศึกษาในครั้งนี้ แม้ว่ามีการเติมอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารสูตรที่ลดองค์ประกอบของแอมโมเนียมไนเตรทและโปแตสเซียมไนเตรท (ไม่แสดงข้อมูล) พบว่า เซลล์ในซัสเพนชั่นมีการเพิ่มปริมาณน้อยกว่าชุดควบคุมในทุกหน่วยการทดลอง ดังนั้นในการทดลองต่อไปควรเพิ่มปริมาณสารอนินทรีย์ไนโตรเจนลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเพียงอย่างเดียว อาจช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ให้สูงขึ้น อัญชลี (2554) เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็ง 2 สูตร คือ MS และ N_6 เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารแข็งสูตร N_6 ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงกว่าสูตร MS ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารสูตร N_6 มีองค์ประกอบของไนโตรเจนบางชนิด (KNO_3 และ KH_2PO_4) สูงกว่าในอาหารสูตร MS ประมาณ 2 เท่า Eltjo และ Daniel (1987) รายงานว่าอาหารสูตร MS ส่งผลให้เซลล์ซัสเพนชั่นมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในทางตรงข้าม ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการพัฒนาที่ต่ำ สาเหตุนี้อาจเกิดจากองค์ประกอบของสูตรอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่ง แหล่งของไนโตรเจนซึ่งมีความแตกต่างกันทั้ง

ชนิดและความเข้มข้น ในระหว่างกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสของ *Medicago sativa* การเติมแอมโมเนียมความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมให้เกิดการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุดและการให้แอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้น 10-20 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Walker และ Sato (1981) ใน alfalfa แสดงให้เห็นว่า ระหว่างการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอต้องมีแอมโมเนียมไอออนอย่างน้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ การเกิดรากจะถูกยับยั้งเมื่อไม่มีแอมโมเนียมไอออนในอาหารหรือมีในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า 50 มิลลิโมลาร์ ในทางตรงข้าม การศึกษาของ Samoyloy และคณะ (1998) แสดงให้เห็นว่า ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารที่ 34.9 มิลลิโมลาร์ (อัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมต่อไนเตรทเท่ากับ 1 ต่อ 4) ส่งผลให้เซลล์ซัสเพนชั่นของถั่วเหลืองมีการเพิ่มปริมาณเร็วที่สุด

3. การศึกษาการเจริญและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

ไดแคมบาเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็ง (อาสลัน, 2545; ซูไฮมิน, 2551; เพ็ญติมาส, 2552; สกุลรัตน์, 2553) ช่วยส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์ได้ดีในชั้น epidermis และ subepidermis การลดความเข้มข้นหรือการไม่เติมออกซินในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงช่วยกระตุ้นการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส เช่นเดียวกับในการศึกษานี้ พบว่าการลดความเข้มข้นของไดแคมบาลงในอาหารที่ย้ายเลี้ยงส่งผลให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ลดลงและส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน ในขณะที่อาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเพียง 75 เปอร์เซ็นต์ โดยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ไม่เติมไดแคมบาให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดที่ 31.83 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเพียง 1.92 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ (ตารางที่ 9) สอดคล้องกับรายงานของอาสลัน (2545) ย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 3 เดือน สามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ 66.67 เปอร์เซ็นต์ เพ็ญติมาส (2552) สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สูงสุด 3.36 เท่า และสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวได้ 6 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง

การเติมผงถ่านส่งเสริมการพัฒนาของเซลล์และการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ในทุกสูตรอาหารที่เติมผงถ่านให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอมากกว่าการลดความเข้มข้นของไดแคมบาลงเพียงอย่างเดียวเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน ในทางตรงข้าม เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 6 เดือน พบว่า อาหารที่เติมผงถ่านและลดความเข้มข้นของไดแคมบาในช่วงความเข้มข้น 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เซลล์และโซมาติกเอ็มบริโอตายทั้งหมด ในขณะที่อาหารเติมไดแคมบา 1 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมผงถ่านส่งผลให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มสูงขึ้นเป็น 117.58 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ สาเหตุนี้อาจเกิดจากการที่ผงถ่านมีการดูดซับไดแคมบาเอาไว้แล้วปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ ผลเป็นไปในทำนองเดียวกับการชักนำกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส สอดคล้องกับการศึกษาของนักวิจัยหลายๆ คน ได้ระบุเอาไว้ว่า ผงถ่านที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยดูดซับหรือปลดปล่อยสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารอินทรีย์ต่างๆ (Constantin *et al*., 1977; Weatherhead *et al*., 1978; Nissen and Sutter, 1990) หรือดูดซับสารยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชที่สร้างขึ้นจากอาหารหรือชิ้นส่วนพืช (Fridborg and Eriksson, 1975; Fridborg *et al*., 1978) นอกจากนี้ Pan และ van Staden (1999) รายงานว่า ผงถ่านที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีทั้งประโยชน์และโทษขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยง

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการรายงานการใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ช่วยในการชักนำการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสของการเพาะเลี้ยงเซลล์ชัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน แต่พบรายงานเฉพาะการใช้ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอและการชักนำ SSE (อาสลัน, 2551; เพ็ญติมาส, 2552) สำหรับการศึกษานี้ พบว่า กระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสเกิดขึ้นเร็วที่สุดในอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1-0.2 โมลาร์ ร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 6 เดือน มีอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดที่ 91.81 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ไม่พบการเกิดของโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารสูตรที่เติมแมนนิทอลเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับซูโครส สอดคล้องกับการศึกษาของอาสลัน (2551) ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลต่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า น้ำตาลแมนนิทอลไม่มีผลช่วยส่งเสริมการงอกหรือการตอบสนองใดๆ ของชิ้นส่วน ในขณะที่น้ำตาลชนิดอื่นๆ ช่วยส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอและการเกิด SSE นอกจากนี้ Brad และ Roberrt (1993) รายงานว่า ซอร์บิทอลเป็นแหล่งของคาร์บอนหลักที่ช่วยส่งเสริมการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของข้าวโพด ในกรณีของข้าว

พบว่า มีการใช้ซอร์บิทอลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 5 กรัมต่อลิตร ในการชักนำแคลลัส 20 กรัมต่อลิตร (Gao *et al*., 2005) ในการเพิ่มปริมาณ และ 40 กรัมต่อลิตร (Wang *et al*., 2001) ในการชักนำพืชต้นใหม่ (Wu *et al*., 2002; Geng *et al*., 2008) สอดคล้องกับการศึกษาของ Agisimanto และคณะ (2011) ในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของส้ม พบว่า สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ 951 เอ็มบริโอ เมื่อย้ายเซลล์ซัสเพนชั่นลงในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 110 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับกาแล็กโตสเข้มข้น 36 มิลลิโมลาร์ โดยไม่ต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

4. การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้อัตราการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 และอัตราการเกิดของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 สูงกว่าอาหารสูตร 1/2MS ในทุกแหล่งที่มาของโซมาติกเอ็มบริโอ สอดคล้องกับการศึกษาของอาสลัน (2551) ซึ่งพบว่า ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ระดับต่างๆ มีผลต่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน อาหารสูตรที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารปกติและเติมน้ำตาลแต่ละชนิดช่วยส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ลดความเข้มข้นองค์ประกอบธาตุอาหาร โดยเฉพาะอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ส่งเสริมการสร้างยอดสูงสุดที่ 40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน นอกจากนี้ SSE ที่เกิดจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำจากอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอลสามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้หลังจากวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 เดือน ในทางตรงข้าม ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการใช้ซอร์บิทอลมีอัตราการงอกน้อยที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากการไม่พัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด สอดคล้องกับการศึกษาของ Mamiya และ Sakamoto (2000) ซึ่งรายงานว่า แรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นจากการใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงส่งผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ทำให้ผลสำเร็จในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Aberlenc-Bertossi และคณะ (1999) ที่รายงานว่า โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่ไม่มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดจึงจำเป็นต้องย้ายลงอาหารสูตรที่เติม BA เพื่อชักนำการพัฒนาของเนื้อเยื่อก่อนแล้วจึงชักนำการงอก อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษานี้ พบว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์

5. การผลิตเมล็ดเทียม

ในการศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมนั้นนับว่า SSE เป็นวัสดุพืชที่มีความเหมาะสมมากกว่า SE เนื่องจากสามารถพัฒนาไปเป็นต้นกล้าที่มียอดและรากได้ SE ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นกล้าได้เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลา 6 เดือน อาจเนื่องมาจาก ไม่มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดและราก สอดคล้องกับการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของ Aberlenc-Bertossi และคณะ (1999) พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นมีอัตราการพัฒนาของยอดน้อย เนื่องจากภายในเอ็มบริโอไม่มีกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด SE ทั้งหมดมีการเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มและเข้าสู่ระยะสร้างจาว หลังจากนั้น จึงสร้าง SSE เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Te-chato และ Hilae (2007) ที่ได้เพาะเลี้ยง SE ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดการสร้าง SSE ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวน SSE 21.55 เอ็มบริโอต่อ SE หลังจากนั้น เมื่อย้ายเลี้ยง SSE อายุ 3 เดือน ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อ ชักนำการงอก พบว่า SSE สามารถงอกได้ถึง 78 เปอร์เซ็นต์ และให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 35.71 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงต่อมาอีกเป็นเวลา 2 เดือน

ในการผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้ SE นั้นพบว่า มีเฉพาะ SE ขนาด 3 มิลลิเมตร ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (แช่ในสารละลายแคลเซียมไนเตรทเป็นเวลา 15 นาที) เท่านั้น ที่สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะสร้างจาวได้ แต่มีการพัฒนาช้ากว่า SE ปกติที่ไม่ได้รับการห่อหุ้มเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอก ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสภาวะเครียดจากการใช้ซอร์บิทอลเปลี่ยนเป็นอยู่ในโซเดียมแอลจิเนตที่ได้รับการจุ่มแช่ในสารละลายอิเล็กโตรไลท์ จึงส่งผลให้ SE หยุดชะงักการเจริญเติบโตและการพัฒนา โดยเฉพาะ SE ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 มิลลิเมตร นอกจากนี้ การผลิตเมล็ดเทียมโดยจุ่มแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ยังส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตของ SE โดยตรง สอดคล้องกับการศึกษาของ Redenbaugh และคณะ (1987) ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของสารอิเล็กโตรไลท์มีผลต่ออัตราการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้รับการห่อหุ้ม Ghosh และ Sen (1994) ได้ศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมของ *Asparagus cooperi* โดยใช้โซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่ในสารละลาย

แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 40 นาที พบว่า ให้อัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอที่ 34 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เป็น 75 หรือ 100 มิลลิโมลาร์ และลดเวลาที่ใช้ในการจุ่มแช่ลงเป็น 15 หรือ 20 นาที ตามลำดับ ส่งผลให้อัตราการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในทำนองเดียวกัน เมื่อใช้แคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100 หรือ 150 มิลลิโมลาร์ และใช้เวลาในการจุ่มแช่น้อยกว่า 15 นาที ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโอเท่ากับศูนย์ ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้ อาจเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างชนิดและความเข้มข้นของแอลจิเนตกับสารละลายแคลเซียม ซึ่งทั้งความเข้มข้นของแอลจิเนตและแคลเซียมมีผลต่อเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาและความแข็งของเมล็ดเทียม (Redenbaugh *et al*., 1991) นอกจากนี้ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ก่อให้เกิดการรวมตัวกันระหว่าง Na^+ และ Cl^- ก็มีความสำคัญมากต่ออัตราการรอดชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโออีกด้วย ในการศึกษานี้ พบว่า SSE มีการตอบสนองได้ดีกว่า SE เมื่อทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต สอดคล้องกับการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านการสร้างแคลลัสบนอาหารแข็งของ Te-chato และ Hilae (2007) รายงานว่า SSE ที่ชักนำได้จากการวางเลี้ยง SE บนอาหารสูตร MS ที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการงอกของต้นกล้าปกติที่มีทั้งยอดและราก หรือยอดเพียงอย่างเดียวสูงสุดถึง 78 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ SE สามารถงอกได้เพียงครึ่งหนึ่งของ SSE (40 เปอร์เซ็นต์) สอดคล้องกับการศึกษาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า SE ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นกล้าได้แต่มีการสร้าง SSE เกิดขึ้น และ SSE ที่ได้สามารถพัฒนาไปเป็นต้นกล้าได้ถึง 57 เปอร์เซ็นต์

ในการศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้ SSE ครั้งนี้ พบว่า SSE ในระยะสร้างใบเลี้ยงสามารถชักนำการงอกและให้ต้นกล้าปกติสูงสุดที่ 9.4 เปอร์เซ็นต์ หรือให้ต้นกล้าที่มีเฉพาะยอดเพียงอย่างเดียว 73 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่มีผลต่อการได้มาซึ่งต้นกล้าที่สมบูรณ์มีสาเหตุมาจากการแยก SSE ออกจาก SE มาเป็นเอ็มบริโอเดี่ยวๆ จากปกติที่ SSE มีการพัฒนาเกาะกันเป็นกลุ่มๆ กระบวนการนี้นอกจากส่งผลโดยตรงต่อเนื้อเยื่อเจริญปลายรากของ SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงแล้ว ยังทำให้เกิดบาดแผลใน SSE ระยะรูปกลมซึ่งทำให้เอ็มบริโอทั้งหมดตาย ในกรณีของ SSE ระยะทอร์ปิโดที่ทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต นั้นมีอัตราการงอกที่ต่ำเพียง 5.8 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิคการผลิตเมล็ดเทียมส่งเสริมให้ SSE มีการพัฒนาที่รวดเร็วขึ้น (ยกเว้นใน SSE ระยะรูปกลม) โดยเฉพาะการห่อหุ้มกลุ่มก้อนของ SSE ระยะรูปกลมส่งผลให้มีการตอบสนองอย่างรวดเร็วภายใน 1 สัปดาห์ Redenbaugh และคณะ (1987) รายงานว่า การห่อหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอด้วยเจลส่งผลให้มีการส่งผ่านสารอาหารเข้าสู่เซลล์พืชได้ดี

ขึ้นจึงมีผลส่งเสริมให้อัตราการรอดชีวิตและความเร็วในการเจริญเติบโตสูงขึ้น นอกจากนี้ การเพิ่มอัตราการงอกและการชักนำให้เกิดต้นกล้าที่สมบูรณ์ ยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารอาหาร สารตัวเติมและฮอร์โมนชนิดต่างๆ ที่เติมลงไปในเมล็ดเทียมหรืออาหารที่ใช้ในการชักนำการงอกอีกด้วย

6. ความแปรปรวนทางพันธุกรรม

เครื่องหมายโมเลกุลมีข้อดีที่สามารถทำการคัดเลือกพืชได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโตและการพัฒนาแม้แต่ในระยะต้นกล้า ทำให้มีข้อได้เปรียบเป็นอย่างมากโดยเฉพาะพืชที่มีวงจรชีวิตยาวนาน เช่นปาล์มน้ำมัน วิธีการดังกล่าวไม่มีอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องและสามารถตรวจสอบลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนด้อยหรือลักษณะที่ไม่สามารถตรวจสอบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานภายนอกได้ จึงเป็นเครื่องหมายที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด ในปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เพื่อระบุเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพืชในหลากหลายชนิดเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ ยังนำมาเป็นฐานข้อมูลสำคัญเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงนำมาใช้เพื่อการจดทะเบียนพันธุ์พืชและใช้ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของปาล์มน้ำมันต้นโตพันธุ์เทเนอราจากสถานีวิจัยและฝึกภาคสนามเทพา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ บนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 30 วัน เป็นเวลากว่า 10 ปี มาใช้ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน หลังจากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอและชักนำการงอกจนได้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่สมบูรณ์ แล้วตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงทั้งในระดับของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เซลล์ซัสเพนชั่นและต้นกล้าปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค RAPD และ SSR

จากการศึกษาของสายชล (2547) ได้ใช้ไพรเมอร์สำหรับเทคนิค RAPD จำนวน 160 ไพรเมอร์ ในการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน พบว่า มีไพรเมอร์จำนวน 8 ไพรเมอร์ ที่มีประสิทธิภาพดีเหมาะสมที่จะใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของปาล์มน้ำมัน คือ OPA-03 OPA-19 OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPB-08 OPR-11 และ OPT-06 นอกจากนี้ ยังมีอีก 2 ไพรเมอร์ ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอได้ คือ OPJ-04 และ OPN-15 ซึ่งไพรเมอร์ที่รายงานข้างต้นให้รูปแบบของดีเอ็นเอจากกลุ่มประชากรต้นปาล์มชนิดเทเนอราเป็น polymorphic จึงมีความ

เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบความสม่ำเสมอของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า จากไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 10 ไพรเมอร์ มี 6 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPB-08 OPN-15 และ OPT-06 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและไม่มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (monomorphic) แสดงให้เห็นว่า การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดขึ้นในระดับดีเอ็นเอ สอดคล้องกับการศึกษาของธนวดี และคณะ (2552) ได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตสูงบนอาหารแข็งโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์และ RAPD พบว่า ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะไพรเมอร์ OPAB-01 และ OPAR-09 ให้ความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอสูงและแถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็น monomorphism จึงสรุปได้ว่า การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารแข็งให้ต้นกล้าที่มีความสม่ำเสมอทางพันธุกรรมสูง Thawaro และ Te-chato (2009) ใช้เทคนิคนี้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มโอในระยะรูปกลมเพื่อดูความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่า ไพรเมอร์ OPT-06 ให้แถบ ดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดและไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ในขณะที่ Rival และคณะ (1998) ใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันรวมถึงลักษณะแมนเทิ้ล พบว่า ในการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 387 ไพรเมอร์ มี 259 ไพรเมอร์ ให้แถบ ดีเอ็นเอชนิด monomorphism และมีเพียง 73 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชนิด polymorphism จากนั้นจึงเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนที่สุดจำนวน 24 ไพรเมอร์ จาก 73 ไพรเมอร์ มาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างต้นแม่ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ในการทดลองครั้งนี้มีเพียง 6 ไพรเมอร์ เท่านั้น ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนจึงอาจไม่มีความน่าเชื่อถือเพียงพอ อีกทั้งเทคนิค RAPD มีการจับกันของดีเอ็นเอแบบสุ่ม เพื่อความมั่นใจและยืนยันผลดังกล่าว จึงได้ทำการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากแหล่งเดียวกันเพิ่มเติมขึ้น

จากการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนตัวอย่างต่างๆ ของปาล์มน้ำมันที่ผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1172 พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด ลักษณะแถบดีเอ็นเอเป็นแบบ monomorphism สอดคล้องกับสกุลรัตน์ (2553) ได้

ตรวจสอบความสม่ำเสมอของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันลูกผสมในระยะต่างๆ คือ แคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้าด้วยเทคนิค SSR พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้รูปแบบ ดีเอ็นเอที่เหมือนกันในทุกระยะพัฒนาการ ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น นอกจากนี้ อัญชลี (2554) ประเมินความแปรปรวนของทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันลูกผสมที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว พบว่า ทุกตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและแถบดีเอ็นเอมีลักษณะเป็น monomorphism จึงไม่มีความแปรปรวน ทางพันธุกรรมเกิดขึ้น โดยเฉพาะไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 500 - 600 คู่เบส ที่จำเพาะกับต้นแม่ขนาด 560 และ 600 คู่เบส และต้นพ่อขนาด 550 คู่เบส Thawaro และ Te-chato (2009) ใช้เทคนิค SSR ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันลูกผสมคู่ผสมต่างๆ ความตรงตามพันธุ์และความสม่ำเสมอของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะ พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR1772 สามารถบ่งชี้ได้ว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นในแคลลัสลูกผสมของปาล์มน้ำมันคู่ผสม 336(D) x 72(P) นอกจากนี้ ไพรเมอร์ EgCIR008 สามารถตรวจสอบความตรงตามพันธุ์และความสม่ำเสมอของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสมเบอร์ 77, 118, 119 และ 137 ในขณะที่ ไพรเมอร์ EgCIR1772 สามารถตรวจสอบลูกผสมเบอร์ 58 และ 130 ได้ จึงสรุปได้ว่าพันธุกรรมมีความจำเพาะเจาะจงกับไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเช่นกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR0008 มีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำมาใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในโคลนนี้ เนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและมีความชัดเจนสูง ดังนั้น จากการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD และ SSR ของเนื้อเยื่อต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น

บทที่ 5

สรุป

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตมีเหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น เมื่อเพาะเลี้ยงและย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน ให้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1-3 มิลลิเมตร ปริมาตร 4.57 มิลลิลิตร

การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นด้วยปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 1.0 มิลลิลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้น 3.61 มิลลิลิตร และคิดเป็น 3.61 เท่า สูงกว่าการใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นที่ 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งให้อัตราการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ 3.57 เท่า

การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารที่เพาะเลี้ยงเป็น 7 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการสร้างและสะสมเม็ดแป้งภายในเซลล์

การย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นที่ความถี่ 15 วันต่อรอบการย้ายเลี้ยง ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 7.74 มิลลิลิตร

อะดีนีนซัลเฟตเป็นอินทรีย์ไนโตรเจนที่ให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดเมื่อเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง โดยอาหารสูตร MS เติมอะดีนีนซัลเฟตความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 5.53 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

อาหารสูตรท MS เติมผงถ่านเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติมไดแคมบาให้โซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 36.83 เอ็มบริโอหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน อาหารสูตรที่เติมไดแคมบา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้โซมาติกเอ็มบริโอ 117.58 เอ็มบริโอ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน

ซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 91.81% หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน ซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดที่ 712.75 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์

โซมาติกเอ็มบริโอขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้อัตราการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 และอัตราการเกิดของ SSE สูงกว่าอาหารสูตร 1/2MS จากทุกแหล่งที่มาของโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน

โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และการเติมผงถ่าน 1 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการงอกสูงสุด 15.83 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารสูตรที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการเกิดของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 สูงสุดที่ 30.83 เปอร์เซ็นต์

SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่หุ้มห่อด้วยโซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแคลเซียมไนเตรทความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ สามารถงอกได้หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกภายใน 1 สัปดาห์ มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 95.24 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการงอก 77.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งงอกเป็นยอด 73.01 เปอร์เซ็นต์ และเป็นราก 4.76 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลา 1 เดือน หลังจากชักนำการงอกเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า SSE ระยะสร้างใบเลี้ยงที่ได้รับการห่อหุ้มสามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ 9.43 เปอร์เซ็นต์

การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและเซลล์ซัสเพนชั่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยเทคนิค RAPD ใช้ 6 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPB-08 OPN-15 และ OPT-06 ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ทุกระดับของการเพาะเลี้ยง

สำหรับเทคนิค SSR พบว่า ทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างและให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน นอกจากนี้ แถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็น monomorphism จึงสรุปได้ว่า ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อในระหว่างขั้นตอนการเพาะเลี้ยงในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพลังงาน. 2549. “ไบโอดีเซล” จากพืชสวน สู่พลังงานระดับชาติ. หนังสือพิมพ์ข่าวสด ฉบับวัน ศุกร์ที่ 20 ตุลาคม พ.ศ. 2549. หน้า 33.

ซูไฮมิน เจ๊ะมาลี. 2551. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทอเนอราโดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธนวดี พรหมจันทร์ อาสลัน หิเล และสมปอง เตชะโต. 2552. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน. วารสารเกษตร 25: 211-218.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2554. การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ: โอ เอส พริ้นติ้งเฮาส์ จำกัด

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ ชัยรัตน์ นิลนนท์ ธีระพงศ์ จันทรนิยม ประกิจ ทองคำ และสมเกียจ สีสนอง. 2548. เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2549. ผู้ยิ่งใหญ่แห่งปาล์มน้ำมัน. ว. เคหะการเกษตร หน้า 76-98.

เพ็ญติมาส กระมุท. 2552. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศักดิ์ศิลป์ โชติสกุล, วินาภรณ์ กุฎีรัตน์ และกิจจารักษ์ วงษ์กุดเลาะ. 2541. ปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ: กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

สมปอง เตชะโต. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันขยายพันธุ์ได้จริงหรือ: กรณีวิจัยที่ผ่านมา. วารสารสงขลานครินทร์ (ฉบับพิเศษ). ปาล์มน้ำมัน. 23: 754-761.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงศ์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สายชล จันมาก. 2547. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแหล่งเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) โดยเทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาสลัน หิเล. 2551. การเพิ่มประสิทธิภาพของการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์. 2554. การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Aberlence-Bertossi, F., Noirot, M. and Duval, Y. 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 53-57.

Agisimanto, D., Noor, N. M., Ibrahim, R. and Mohamad, A. 2011. Efficient somatic embryo production of Limau madu (*Citrus suhuiensis* Hort. ex Tanaka) in liquid culture. African Journal of Biotechnology 11: 2879-2888.

Avril, L. B., Richard, L. B. and Jennet, B. 1986. Regeneration in palm. *In* Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. (ed. I. K. Vasil) Vol. 3, pp. 207-222. London: Academic Press.

Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Amsterdum, Netherlands: Elsevier Science B.V.

Billotte, N., Marseillac, N., Risterucci, A. M., Adon, B., Brottier, P., Baurens, F. C., Singh, R., Herra, A., Asmady, H., Billot, C., Amblard, P., Durand-Gasselin, T., Courtois, B., Asmono, D., Cheah, S. C., Rohde, W., Ritter, E. and Charrier A. 2005. Microsatellite- based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theoretical and Applied Genetics 110: 754-765.

Brad, S. and Roberrt, D. L. 1993. Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. Plant Physiology 103: 1339-1346.

Bronsema, F. B. F., van Oostveen, W. J. F. and van Lammeren, A. A. M. 1997. Comparative análisis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A 188 and a 632. Plant Cell Reports 50: 57-65.

Caplin, S. M. and Steward, F. C. 1949. A technique for the controlled growth of excised plant tissue in liquid media under aseptic conditions. Nature 163: 920.

Chawla, H. S. 2004. Cell suspension and secondary metabolites. *In* Introduction to plant biotechnology. (ed. H. S. Chawla), pp. 57-73. New Hampshire, United States of America: Science publishers Enfield.

Choi, D., Andrade, M. H. C., Willis, L., Cho, C., Schoenheit, J., Boccazzi, P., Sambanthamurthi, R., Sinskey, J. and Rha, C. 2008. Effect of agitation and aeration on yield optimization of oil palm suspension culture. Journal of Oil Palm Research 1: 23-34.

Cipriani, G., Bella, R. and Testolin, R. 1996. Screening RAPD primer for molecular taxonomy and cultivar fingerprinting in genus *Actinidia.* Euphytica 90: 169-174.

Constantin, M. J., Henke, R. R. and Mansur, M. A. 1977. Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. *In vitro* 13: 293-287.

Corley, R. H. V. and Tinker, P. B. 2003. The Oil Palm, 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing.

Datuk Y. B. 2003. Selling the green palm oil advantage? Oil Palm Industry Economic Journal 4: 42p.

de Touchet, B., Duval, Y., and Pannetier, C. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Cell Reports 10: 529-532.

de Vienne, D. 2003. Molecular markers in plant genetics and biotechnology. Enfield (NH), USA, Plymouth, UK: Science Publishers, Inc.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12 : 13-15.

Duval, Y., Aberlenc, F. and de Touchet, B. 1995a. Use of embryogenic suspension for oil palm micropropagation. *In* Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology. (eds. V. Rao, I. E. Henson and N. Rajanaidu), pp. 38-47. Bangi: Palm Oil Research Institute of Malaysia.

Duval, Y., Besse, I., Verdeil, J. L. and Maldiney, R. 1995b. Study on the induction of floral morphogenesis abnormality in oil palm during the *in vitro* regeneration process. *In* Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology. (eds. V. Rao, I. E. Henson, and N. Rajanaidu), pp. 64-76. Bangi: Palm Oil Research Institute of Malaysia.

Duval, Y., Engelmann, F. and Durand-Gasselin, T. 1995c. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry. (ed. Y. P. S. Bajaj) Vol. 30, pp. 335-352. Heidelberg: Springer-Verlag.

Duval,Y., Rival, A., Verdeil, J. L. and Buffard-Morel, J. 1993. Advances in oil palm and coconut micropropagation. Proceedings of the Southeast Asian Regional Workshop on Propagation Techniques for Commercial crops of the tropics. Monpellier, France, 12 February 1993, pp. 106-116.

Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconus palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum 36: 8-23.

Eeuwens, C. J. 1978. Effects of organic nutrient and hormones on growth and development of tissue explants from coconus (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) plams cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum 15: 97-473.

Eltjo, G. M., M. and Daniel, C. W. B. 1987. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 11-19.

Fiji, J. J., Slade, D. T., Redenbaugh, K. and Walker, K. A. 1987. Artificial seed for plant propagation. Trends in Biotechnology 5: 3353-3359.

Finer, J. J., Kriebel, H. B. and Beewar, M. R. 1989. Initiation of embryogenic callus and suspension culture of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). Plant Cell Reports 8: 203-206.

Fridborg, G. and Eriksson, T. 1975. Effects of activated charcoal on morphogenesis in plant tissue cultures. Physiology Plant 34: 306-308.

Fridborg, G., Pedersen, M. L. and Eriksson, T. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiology Plant 43: 104-106.

Gao, L. L., Chen, Y. L. and Jian, Y. Y. 2005. Research of improvement of inducing and proliferation rate for rice (*Oryza sativa* L. Subsp. indica). Guangdong Journal of Agricultural Science 4: 28-30.

Geng, P., La, H., Wang, H. and Stevens, E. J. C. 2008. Effect of sorbitol concentration on regeneration of embryogenic calli in upland rice varieties (*Oryza sativa* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 92: 303-313.

George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1: The Technology. Edington, England: Exegetics Ltd.

George, E. F. and Sherrington, P. D. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Eversley, UK: Exegetics Ltd.

Ghosh, B. and Sen, S. 1994. Plant regeneration from alginate encapsulation somatic embryos of *Asparagus cooperi* Baker. Plant Cell Reports 13: 381-385.

Gorret, N., Bin Rosli, A. K., Oppenheim, S. F., Willis, L. B., Lessard, P. A., Rha, C. K. and Sinskey, A. J. 2004. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and effects of nitrogen source, inoculums size, and conditioned medium on biomass production. Journal of Biotechnology 108: 253-256.

Guidi, L., Lorefice, G., Pardossi, A., Malorgio, F., Tognoni, F. and Soldatini, G.F. 1998. Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 40: 235-244.

Hilae, A. and Te-chato, S. 2005. Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Songklanakarin Journal of Science Technology 27: 629-635.

Hristoforoglu, K., Schmidt, J. and Bolhar-Nordenkampf, H. 1995. Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 277-284.

Hughes, W. A., Bociek, S. M., Barrett, J. N. and Ratcliffe, R. G. 1983. An investigation of the growth characteristics of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) suspension cultures using ^{31}P NMR. Bioscience Reports 3: 1141-1148.

Iraqi, D. and Tremblay, F. M. 2001. The role of sucrose during maturation of black spruce [*Picea mariana* (Mill.) BSP] and white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos. Physiologia Plantarum 111: 381-388.

Jain, V., Pal, M., Lakkineni, K. C. and Abrol, Y. P. 1999. Photosynthetic characteristics in two wheat genotypes as affected by nitrogen nutrition. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 42: 217-222.

Jay, V., Genestier, S. and Courduroux, J. C. 1992. Bioreactor studies on the effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota* L.) cell cultures. Plant Cell Reports 11: 605-608.

Kanchanapoom, K. and Domyoas, P. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. ScienceAsia 25: 193-200.

Kanchanapoom, K. and Tinnongjig, S. 2001. Histology of embryoid development in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cell suspension culture. Songklanakarin Journal of Science and Technology 23: 643-648.

Khaw, C. H. and Ng, S. K. 1997. Performance of commercial scale clonal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) planting in Malaysia. Paper Present at International Society of Horticultural Science Symposium. Brisbane, Australia, 29 September – 3 October 1996, p. 8.

Khaw, C.H. and Ng, S.K. 1999. Agrocom's proven tissue culture technology for oil palm. Presented at the Special Meeting on "Potential of the Oil Palm Industry and

Clonal Tissue- Cultured Oil Palm Development in South Thailand", Marrytime Hotel, Krabi, Thailand, 6th November 1999, pp. 1-10.

Khlifi, S. and Tremblay, F. M. 1995. Maturation of black spruce somatic embryos. Part I. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41: 23-32.

Kushairi, A., Tarmizi, A. H., Zamzuri, I., Ong-Abdullah, M., Samsul, K. R., Ooi, S. E. and Rajanaidu, N. 2010. Production, Performance and Advances in Oil Palm Tissue Culture. The International Seminar on Advances in Oil Palm Tissue Culture. The International Society for Oil Palm Breeders, Yogyakarta, Indonesia, 29 May 2010, pp. 1-23.

Lee, M.S. and Kirby, E. G. 1986. Growth parameters of cell suspension cultures of *Pseudotsuga menziesii* and effects of nitrogen sources on growth. New Zealand Journal of Forestry Science 16: 369-376.

Leifert, C., Murphy, K. P. and Lumsden, P. J. 1995. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. Critical Reviews in Plant Science 14: 83-109.

Li, X. B., Xu, Z. H. and Wei, Z. M. 1995. Plant regeneration from protoplasts of immature *Vigna sinensis* cotyledons via somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 15: 282-286.

Loiseau, J., Marche, C. and Le-Deunf, Y. 1995. Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41: 267-275.

Maizura, I., Rajanaidu, N., Zakri, A.H. and Cheah, S. C. 2006. Assessment of genetic diversity in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Genetic Resources and Crop Evolution 53: 187-195.

Mamiya, K. and Sakamoto, Y. 2000. Effects of sugar concentration and strength of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L. Scientia Horticulturae 84: 15-26.

Mashayekhi-Nezamabadi, K. 2000. The Protein Synthesis Spectrum during the Induction Phase of Somatic Embryogenesis in Carrot (*Daucus carota* L.) Cultures and the Role of Nitrogen Forms for Embryo Development. Ph.D. Dissertation. Justus Liebig University.

Mohan, J. S. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118: 153-166.

Mordhorst, A. P. and Lorz, H. 1993. Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant 142: 485-492.

Morel, G. and Wetmore, R. H. 1951. Tissue culture of monocotyledons. American Journal of Botany 38: 141-143.

Moretzsohn, M. C., Nunes, C. D. M., Ferreira, M. E. and Grattapaglia, D. 2000. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theoretical and Applied Genetics 100: 63-70.

Moretzsohn, M. C., Ferreira, M. A., Amaral, Z. P. S., Coelho, P. J. A., Grattapaglia, D. and Ferreira, M. E. 2002. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H. B. K.) germplasm collected in the Amazon Forest. Euphytica 124: 35-45.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-479.

Mutert, E. and Fairhurst, T. H. 1999. Oil palm clones: productivity enhancement for the future. Better Crops International 13: 45-47.

Niedz, R. P. 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39: 1-5.

Nissen, S. J. and Sutter, E. G. 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. Hort-Science 25: 800-802.

Nitsch, J. P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology 19: 389-404.

Norgaard, J. V. and Krogstrup, P. 1991. Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* LK. Plant Cell Reports 9: 509-513.

Padgett, P. E. and Leonard, R. T. 1996. Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. Journal of Experimental Botany 47: 871-883.

Pan, M. J. and van Staden, J. 1999. Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. Plant Growth Regulation 29: 135-141.

Paranjothy, K. 1987. Recent development in cell and tissue culture of oil palm. Malaysian Applied Biology 16: 119-127.

Paranjothy, K. and Rohani, O. 1982. *In vitro* propagation of oil palm. Proceedings of the 5th. Congress Plant Tissue and Cell Culture. (ed. A. Fujiwara) Maruzen, Tokyo, 11-16 July 1982, pp. 747-748.

Pavel, A. V., Pusch, I., Mix-Wagner, G. and Vorlop, K. D. 2000. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. Plant Cell Reports 19: 868-874.

Powell, W., Machray, C. and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeat. Trends in Plant Science 1: 215-222.

Preece, J. E. 1995. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? Plant Tissue Culture and Biotechnology 1: 26-37.

Rabechault, H. and Martin, J. P. 1976. Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. Comptes Rendus de l' Académie des Sciences 238: 1735-1737.

Rajanaidu, N., Rohani, O. and Jalani, S. 1997. Oil palm clone: current status and prospects for commercial production. The Planter 73: 163-184.

Ramakrishnan, K., Gnanam, R., Sivakumar, P. and Manickam, A. 2005. *In vitro* somatic embryogenesis from cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. Plant Cell Reports 24: 449-461.

Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P. and Fujii, J. A. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. HortScience 22: 803-809.

Redenbaugh, K., Fujii, J. A., Slade, D., Viss, P. and Kossler, M. 1991. Artificial seeds encapsulated embryos. *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry, High Technology and Micropropagation I (ed. Y. P. S. Bajaj) vol.17, pp. 395-416. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Reynolds, J. F. and Murashige, T. 1979. Plant cell line. *In* Methods in Enzymology (eds. W. B. Jakoby and I. H. Pastan) Vol. 58, pp. 478-486. New York: Academic Press.

Rho, D. and Andre, G. 1991. Growth and stoichiometry of a *Catharantus roseus* cell suspension culture under nitrogen limiting conditions. Biotechnology and Bioengineering 38: 579-587.

Rival, A. 2000. Somatic embryogenesis in oil palm. *In* Somatic Embryogenesis in Woody Plants, (eds. S. M. Jain, P. K. Gupta and R. J. Newton) Vol. 6, pp. 249-290. the Natherland: Kluwer Academic Publishers.

Rival, A., Bertrand, L., Beule, T., Combes, M. C., Trouslot, P. and Lashermes, P. 1998. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm *(Elaeis guineensis* Jacq). Plant Breeding 117: 73-76.

Robichaud, R. L., Lessard, V. C. and Merkle, S. A. 2004. Treatments affecting maturation and germination of American chestnut somatic embryos. Journal of Plant Physiology 161: 957-969.

Saiprasad, G. V. S. 2001. Artificial Seeds and their Applications. Resonance 6: 39-47.

Samoylov, V. M., Tucker, D. M. and Parrott, W. A. 1998. Soybean [*Glycine max* (L. Merr.)] embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant 34: 8-13.

Schuller, A. and Reuther, G. 1993. Response of *Abies alba* embryonal- suspensor mass to various carbohydrate treatments. Plant Cell Reports 12: 199-202.

Shimazu, T. and Kurata, K. 1999. Relationship between production of carrot somatic embryos and dissolved oxygen concentration in liquid culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57: 29-38.

Shimazu, T. and Kurata, K. 2003. Dynamic dissolved oxygen concentration control for enhancing the formation rate of torpedo-stage embryos in carrot somatic embryo culture. Journal of Bioscience and Bioengineering 95: 384-390.

Soh, A. C., Wong, G., Tan, C. C., Chong, S. P., Choo, C. N., Nor Azura, A. and Ho, Y. W. 2006. Advances and issues in commercial propagation of oil palm clones. Proceedings of the Clonal and Quality Replanting Material Workshop: Towards Increasing the Annual National Productivity by One Tonne FFB/ha/year. (eds. K. Ahmad, S. Ravigadevi, O. A. Meilina and K. C. Chang) Malaysia Palm Oil Board, Selangor, Malaysia, 10 August 2006, pp. 35-55.

Sondahl, M. R. 1991. Tissue culture of cacao, coffee and oil palm. Proceedings of the 4th IPBNet Conference, Biotechnology for Tropical Crop Improvement in Latin America. San Jose, Costa Rica, 14-18 January 1991, 98 p.

Taber, R. P., Zhang, C. and Hu, W. S. 1998. Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. Canadian Journal of Botany 76: 863-871.

Tahardi, T. S. 1999. Improvement of somatic embryogenesis in oil palm by periodic immersion culture. International Oil Palm Conference Commodity of the Past, Today and the Future. Bali, Indonesia, 23-25 September 1998, pp. 595-601.

Tarmizi, A. H. 2002. Oil palm liquid culture – MPOB protocol: *MPOB Information Series* TT No. 138.

Tarmizi, A. H.,Norjihan, M. A. and Zaiton, R. 2003. Multiplication of oil palm suspension culture in a bench-top two litre bioreactor. Journal of Oil Palm Research 16: 44-49.

Te-chato, S. 1998. Fertile plant from young leaves-derived somatic embryo of oil palm. Songklanakarin Journal of Science and Technology 20: 7-13.

Te-chato, S. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in somaclones of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Thai Journal of Agricultural Science 33: 137-145.

Te-chato, S. and Hilae, A. 2007. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. *var*. tenera). Journal of Agricultural Technology 3: 345-357.

Texeira, J. B., Sondahl, M. R. and Kirby, E. G. 1993. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 105-111.

Texeira, J. B., Sondahl, M. R. and Kirby, E. G. 1994. Somatic embryogenesis from immature infloresecences of oil palm. Plant Cell Reports 13: 247-250.

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R., Nakamura, T. and Kirby, E. G. 1995. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 105-111.

Thawaro, S. and Te-chato, S. 2009. Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated *in vitro*. ScienceAsia 35: 142-149.

Tremblay, L. and Tremblay, F. M. 1991. Carbohydrate requirements for the development of black spruce [*Picea mariana* (Mill.) BSP] and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 95-103.

Tremblay, L. and Tremblay, F. M. 1995. Maturation of black spruce somatic embryos: sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 39-46.

Verhagen, S. A. and Warm, S. R. 1989. Norway spruce somatic embryogenesis: high-frequency initiation from light-cultured mature embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16: 103-111.

Walker, K. A. and Sato, S. J. 1981. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion on somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1: 109-121.

Wang, Z., Pan, X. and Tang, K. 2001. Research on improving tissue culture of Indica rice varieties. Journal of Yangzhou University - Natural Science 4: 37-41.

Weatherhead, M. A., Burdon, J. and Henshaw, G. G. 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. ZPflanzenphysiol 89: 141-147.

Williams, J. G. K., Kubelik, R. A., Livak, J. K., Rafalski, A. J. and Tingey, V. S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

Winter, P. and Kahl, G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11: 438-448.

Wong, G., Tan, C. C. and Soh, A. C. 1996. Large scale propagation of oil palm clones: Experiences to date. Acta Horticulturae 447: 649-658.

Wooi, K. C. 1995. Oil palm tissue culture current practice and constraints. *In* Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology. (eds. V. Rao, I. E. Henson and N. Rajanaidu) pp. 57-67. Bangi: Palm Oil Research Institute of Malaysia.

Wu, C., Wan, Y., Xu, J., Su, J. and Fang, X. 2002. Establishment of a rice transformation system by regeneration of embryonic callus induced from mature embryo sputum. Chinese Journal of Tropical Crops 23: 88-94.

Zhang, B. H., Liu, F. and Yao, C. B. 2000. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 89-94.

Zouine, J. and Hadrami, I. E. I. 2007. Effect of 2, 4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae 112: 221-226.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายบัพเฟอร์ และสารละลายอื่น ๆ

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato และคณะ (2000)

1. TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	500	ไมโครลิตร
0.1 EDTA (pH 8.0)	200	ไมโครลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	500	มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. SDS ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

SDS	5	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	50	มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Ammonium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ammonium acetate	38.54	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ก่อนนำไปกรองด้วยมิลลิพอร์

4. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

5. TAE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	121.1	กรัม
Acetic acid	28.5	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2 EDTA (pH 8.0)	50	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

6. TBE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	54	กรัม
Boric acid	27.5	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2 EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1000	มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สารเคมีที่ใช้ในการทำ Denaturing electrophoresis

1. 6% Polyacrylamide gel (Acrylamide : Bisacrylamide = 29:1) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

30 % Acrylamide Bis-acrylamide solution (29:1)	60	มิลลิลิตร
5X TBE	60	มิลลิลิตร
Urea	35	กรัม
น้ำกลั่น	105	มิลลิลิตร

2. TBE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	54	กรัม
Boric acid	27.5	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2 EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1000	มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. 10% (W/V) Ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Ammonium persulfate	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 6X Loading buffer (สำหรับ Denaturing polyacrylamide gel) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

Formamide	950	ไมโครลิตร
5% Bromophenol blue	10	ไมโครลิตร
1 M EDTA	20	ไมโครลิตร

แบ่งสารละลายใส่หลอดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. Bind silane สำหรับทากระจกแผ่นหลังที่ติดกับเจล

Bind silane	1	ไมโครลิตร
Glacial acetic acid	2.5	ไมโครลิตร
95% Ethanol	500	ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอด้วย Silver nitrate

1. Fixation และ Stop solution (10% Acetic acid) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

2. 0.2% Silver nitrate ปริมาตร 1,000 มิลลิตร

Silver nitrate	2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. Develop solution ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Sodium carbonate	25	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้เย็นจัดก่อนนำมาใช้ ขณะใช้เติม Formaldehyde เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ Sodium thiosulfate เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) Eeuwens (Y_3) และ MSMo

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	MS	Y_3	MSMo
ธาตุอาหารหลัก			
NH_4NO_3	1,650	-	1,300
NH_4Cl	-	535	-
KNO_3	1,900	2,020	1,200
KCl	-	1,492	-
KH_2PO_4	170	-	700
$NaH_2PO_4.1H_2O$	-	312	-
$CaCl_2.2H_2O$	440	294	360
$MgSO_4.7H_2O$	370	247	300
ธาตุอาหารรอง			
KI	0.83	8.3	0.83
H_3BO_3	6.2	3.1	10
$MnSO_4.H_2O$	16.9	11.2	18.9
$ZnSO_4.7H_2O$	10.6	7.2	10
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.16	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.24	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.24	0.025
$NiCl_2.6H_2O$	-	0.024	-
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	27.8	24.9
Na_2EDTA	37.3	37.3	-
EDTA	-	-	26.1
สารอินทรีย์			
Myo-inositol	100	-	100
Nicotinic acid	0.5	-	1
Pyridoxine HCl	0.5	-	1
Thaiamine HCl	0.1	-	1
Glycine	2	-	-
Ca Pantothenate	-	-	1
Sucrose (กรัม)	30	30	30
วุ้น(กรัม)	7.5	7.5	7.5

ตารางภาคผนวกที่ 2 ไพรเมอร์ RAPD ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Primer name	ลำดับเบส 5' → 3'
OPAB-01	GGGCGACTAC
OPAB-09	CCGTCGGTAG
OPAB-14	CAAGGGCAGA
OPR-11	AAGTGCGACC
OPT-06	GTAGCCGTCT
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPB-08	GTCCGTATGG
OPA-19	GTCCACACGG

ตารางภาคผนวกที่ 3 ไพรเมอร์ SSR ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Primer name	5’ → 3’ Forward primer	5’ → 3’ Reveres primer
EgCIR0008	CGGAAAGAGGGAAGATG	ACCTTGATGATTGATGTGA
EgCIR0243	TGGAACTCCTATTTACTGA	GCCTCGTAATCCTTGTCA
EgCIR0337	GTCTGCTAAAACATCAACTG	GAGGAGGAGGGGAACGATAA
EgCIR0409	AGGGAATTGGAAGAAAAGAAAG	TCCTGAGCTGGGGTGGTC
EgCIR0446	CCCCTTCGAATCCACTAT	CAAATCCGACAAATCAAC
EgCIR0465	TCCCCCACGACCCATTC	GGCAGGAGAGGCAGCATTC
EgCIR0781	CCCCTCCCTACCACGTTCCA	TGTTTGCTGTTGCTCTTTGATTTTC
EgCIR0905	CACCACATGAAGCAAGCAGT	CCTACCACAACCCCAGTCTC
EgCIR1772	CTTCCATTGTCTCATTATTCTCTTA	ACCTTGTATTAGTTTGTCCA

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายคมกฤษณ์ อินเปื่อย

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010630002

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากทุนบัณฑิตศึกษาสงขลานครินทร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ทุนสนับสนุนการเดินทางไปทำ งานวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ในต่างประเทศของนักศึกษาระดับปริญญาเอก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ทุนสนับสนุนภายใต้ความร่วมมือ (MOU) ระหว่างคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กับมหาวิทยาลัย Miyazaki ประเทศญี่ปุ่น

ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนสนับสนุนศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

คมกฤษณ์ อินเปื่อย และสมปอง เตชะโต. 2553. ผลของความเข้มข้นของซูโครสและ adenine sulfate ต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) 41: 229-232.

Inpeuy, K., Chaemalee, S. and Te-chato, S. 2011. Cytokinins and coconut water promoted abnormalities in zygotic embryo culture of oil palm. Songklanakarin J. Sci. Technol. 33 (6): 653-657.

Inpuay, K., Arthipatjaporn, A. and Te-chato, S. 2012. Assessment genetic instability of regenerated plantlets from long-term culture of oil palm through SSE formation by SSR marker. Journal of Agricultural Technology 8 (2): 607-617.

Inpuay, K. and Te-chato, S. 2012. Primary and secondary somatic embryos as tool for the propagation and artificial seed production of oil palm. Journal of Agricultural Technology 8(2): 619-631.